



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

Trabajo de Tesis realizado como requisito para optar al título de
DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS

RESPUESTA INMUNE LOCAL EN LA
PATOGENIA DEL ABORTO INDUCIDO POR
HERPESVIRUS EQUINO 1

Autor: Méd. Vet. BRAVI María Emilia

DIRECTORAS: Dra. Galosi Cecilia M. y Dra. Zanuzzi Carolina N.
Cátedras de Virología e Histología y Embriología. FCV-UNLP

Miembros del jurado:

Dra. Dolcini Guillermina

Dra. Monteavaro Cristina

Dra. Rambeaud Magdalena

2018

A mis hijos, Catalina y Ciro

*De todo quedaron tres cosas:
la certeza de que estaba siempre comenzando,
la certeza de que había que seguir
y la certeza de que sería interrumpido antes de terminar.
Hacer de la interrupción un camino nuevo,
hacer de la caída, un paso de danza,
del miedo, una escalera,
del sueño, un puente,
de la búsqueda, ...un encuentro.*

Fernando Pessoa

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a mis directores, quienes me guiaron y siempre tuvieron gran dedicación y compromiso para transmitir sus conocimientos, formando un excelente grupo de trabajo, pero sobretodo de personas y a quienes admiro muchísimo por su trayectoria;

A Ceci, por darme la oportunidad de conocer el mundo de la investigación y por confiar en mí, por ponerle amor antes que todo, amor a lo que uno hace y con quien trabaja, enseñando con el ejemplo. Por ser tan buena persona y comprensiva, por sus sabias palabras y grandes consejos. Para mí fue un orgullo ser su becaria; la última de un largo camino.

A Caro, por brindarme su apoyo y honestidad, por sus consejos y el tiempo que dedicó siempre con gran responsabilidad, compromiso y cariño.

A Claudio, que fue el docente que me tomó mi primer final durante la carrera y desde ese momento admire su vocación por enseñar y hasta el día de hoy me gusta escuchar sus consejos acompañados siempre con alguna anécdota, que demuestra su sabiduría.

A mi querida facultad pública: la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata, por la formación académica brindada.

A la Agencia de Promoción Científica y Tecnológica (FONCyT), y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por permitirme desarrollar profesionalmente.

A Nadia por su continua compañía y enseñanza, su gran apoyo y su tiempo, siendo una parte muy importante de mi formación. Y especialmente por las charlas, los mates y su amistad diaria. Y a Hernán, por su desinteresada ayuda, y estar siempre predispuesto a brindarme sus conocimientos que fueron de gran ayuda en la realización de esta tesis.

A la Dra. Teresa Ester González por haberme permitido ingresar a Virología.

A Gaby y Marcelo por su colaboración y su apoyo. Y al resto de mis compañeros de Virología: Ale, Mariela, Lauri, Pancho, Sole, Ger, Lau, Marie, Mer, Javi, Lean, Marco, Caro, Vivi, Rocío, Ale. También a Adri por confiar en mí para recomendarme cuando inicie en el laboratorio, y especialmente a Fito, de quién después de años me di cuenta que aprendí mucho más que el manejo de un laboratorio. Gracias a todos

por su compañerismo, su ayuda y sus consejos, acompañados de tantas rondas de mate... Gracias por hacer del laboratorio mi segunda casa.

A Fabián Nishida y Santiago Corva por la colaboración en el análisis estadístico de los datos.

A Cecilia Muglia de la Facultad de Ciencias Exactas (UNLP), por su colaboración y por brindarme sus conocimientos que fueron de gran ayuda en la realización de esta tesis.

Gracias a todos por contribuir de una u otra manera en mi crecimiento.

A mis amigas del alma: Vale, Ceci, Mari, Lu, Cande, Pame, Flor; a mis amigas que por suerte también son mis primas: Cocky, Lali, Micky, Male, Romi, Pame, Jime; y a mis amigas colegas, que son lo más lindo de esta profesión. A mi gran compañero de ruta, Bruno. Todos son una parte fundamental de mi vida.

A mi estrella Mati, que su amistad me enseñó el valor de la vida y me acompaña todos los días, haciendo de mí lo que soy hoy. Gracias por no dejarme bajar los brazos nunca.

A mis hermanos, Bárbara y Julián, mis personas preferidas: *para todos todo*. A Justina, la pequeña revolucionaria que me hizo tía, y a todos mis sobrinos que llenan de diversión nuestros días.

A mi papá, de quién herede el amor por la naturaleza y los animales. A mi mamá, por su incondicionalidad y por cuidar con tanto amor a mis hijos para que yo pueda seguir estudiando y trabajando.

A ellos por su amor tan puro y por darme alas para llegar a donde estoy.

A Juan, mi compañero, por su paciencia, por apoyarme y acompañarme siempre.
A Catalina y Ciro, por ser la energía que hace que todo valga la pena.

PUBLICACIONES PARCIALES DEL TRABAJO DE TESIS

PUBLICACIONES EN REVISTAS NACIONALES E INTERNACIONALES CON REFERATO

TRABAJO COMPLETO

Modelos experimentales para el estudio de la patogenia de la muerte embrionaria en tritricomonosis bovina y herpesvirosis equina.

Galosi CM, Monteavaro C, Woudwyk MA, Zanuzzi CN, Portiansky EL, Fuentealba NA, Scrochi MR, Nishida F, **Bravi ME**, Eöry ML, Martin Ocampos GP, Cid de la Paz V, Barbeito CG, Gimeno EJ.

Anales de la Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria. LXVII: 239-332. **2013 (Publicado en 2015)**. Recopilación y actualización. Con referato (ISSN 0327-8093) (Researchgate) **DOI:** 10.13140/RG.2.1.1952.1766

Production of equine herpesvirus 1 recombinant glycoprotein D and development of an agar gel immunodiffusion test for serological diagnosis

Nadia Fuentealba, Guillermo Sguazza, Mariela Scrochi, **Maria Bravi**, Carolina Zanuzzi, Santiago Corva, Eduardo Gimeno, Marcelo Pecoraro, Cecilia Galosi.

Journal of Virological Methods 202: 12-14, **2014**. Con referato (ISSN: 0166-0934) **IF: 2,011**

Protective effects of intranasal immunization with recombinant glycoprotein D in pregnant BALB/c mice challenged with different Equine herpesvirus 1 strains.

Nadia Analía Fuentealba, Carolina Natalia Zanuzzi, Mariela Rita Scrochi,

Guillermo Hernan Sguazza, **Maria Emilia Bravi**, Viviana Cid de la Paz, Santiago Gerardo Corva, Enrique Leo Portiansky, Eduardo Juan Gimeno, Claudio Gustavo Barbeito, Cecilia Monica Galosi. J Comparative Pathol 151: 384-393, **2014**. Con referato (ISSN: 0021-9975) **IF: 1,647**.

Microvascular lesions and changes in cell proliferation and death, and cytokine expression in the placentas of mice experimentally infected with *Equid Herpesvirus 1*.

CN Zanuzzi, ME Bravi, , MR Scrochi, F Nishida, NA Fuentealba, ME Diessler, HG Sguazza, CI, Muglia, EJ Gimeno, EL Portiansky, CG Barbeito, CG Galosi. Res.Vet.Sci, 109: 121–128, 2016. Con referato (ISSN:0034 5288) **IF: 1,504**
Zanuzzi CN y Bravi ME comparten primera autoría.

Investigation of apoptosis in cultured cells infected with equine

herpesvirus 1. Scrochi MR; Zanuzzi CN; Fuentealba NA; Nishida F; **Bravi ME**; Pacheco ME; Sguazza GH; Gimeno EJ; Portiansky EL; Muglia CI; Galosi CM, Barbeito CG. Biotech Histochem. 2017 Nov 21:1-9. doi: 10.1080/10520295.2017.1359749. Con referato (ISSN: 1052-0295). **IF:1041**

RESÚMENES

Modulation of apoptosis in equine herpesvirus-1 infected cells Scrochi

MR, Zanuzzi CN, Fuentealba NA, **Bravi ME**, Gimeno EJ, Barbeito CG, Portiansky EL, Muglia CI, Galosi CM.

BIOCELL 38 (Suppl. 3), A 67. **2014** Con referato (ISSN 0327-9545). **IF 2013: 0,730**

Pathogenic and immunological study of equine herpesvirus 1 infection (EHV-1). New insights in prophylactics strategies. Scrochi MR, **Bravi ME**,

Fuentealba NA, Sguazza GH, Nishida F, Cid de la Paz V, Gimeno EJ,

Portiansky EL, Barbeito CG, Muglia CI, Zanuzzi CN, Galosi CM. Virus Reviews and Research. ***Journal of the Brazilian Society for Virology 20 (S1):217, 2015.*** Con referato (ISSN 1519- 2563).

Scrochi MR, Bravi ME, Fuentealba NA comparten primera autoria (resultados de los tres objetivos del PICT 2011-1123)

Estudios patogénicos-moleculares asociados a la infección por *Herpesvirus equino*1.

Bravi ME, Scrochi MR, Fuentealba NA, Sguazza GH, Nishida F, Cid de la Paz V, Corva SG, Barbeito CG, Gimeno EJ, Portiansky EL, Muglia CI, Zanuzzi CN, Galosi CM.

XXIII Jornadas Jóvenes investigadores de AUGM, Universidad Nacional de La Plata, 25-27 de agosto de 2015.
<http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/52724>

Estudios preliminares sobre la respuesta inmune inducida por las glicoproteínas D y C del Herpesvirus equino 1 (EHV-1) en ratones BALB/c. Fuentealba NA, **Bravi ME**, Scrochi MR, Sguazza GH, Zanuzzi CN, Gimeno EJ, **Galosi CM**. Revista de Medicina Veterinaria 97 (1): 100, **2016** Con referato ISSN 1852-771X.

Immunological changes in BALB/c pregnant mice model induced by intranasal infection with Equine herpesvirus 1. **Bravi ME**, Scrochi MR, Fuentealba NA, Sguazza GH, Nishida F, Cid de la Paz V, Corva SG, Gimeno EJ, Portiansky EL, Barbeito CG, Muglia CI, Zanuzzi CN, **Galosi CM**.

J Eq Vet Sci 39: S64-S65 (Resumen), **2016** Con referato (ISSN: 0737-0806) **IF:0.871**.

PRESENTACIONES EN REUNIONES CIENTIFICAS

Estandarización del tiempo posinfección para el estudio de la respuesta inmune local en la patogenia del aborto inducido por el Herpesvirus equino 1.

Bravi ME, Scrochi MR, Fuentealba NA, Sguazza HG, Muglia CI, Nishida F, Portiansky EL, Barbeito CG, Gimeno EJ, Zanuzzi CN, Galosi CM.

IX REUNIÓN ARGENTINA DE PATOLOGÍA VETERINARIA 2014. 8^{vo} Seminario de la Fundación "Charles Louis Davis" en Argentina. Facultad de Ciencias Veterinarias - Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Tandil; 29, 30 y 31 de octubre de 2014 (Poster).

Repuesta inmune local en la patogenia del aborto inducido por *Herpesvirus equino 1*

Bravi ME, Galosi CM, Zanuzzi CN

Jornadas de Ciencia y Técnica 2014. 27 y 28 de noviembre de 2014. (Exposición oral)

Cambios moleculares a nivel de la respuesta inmune local ante la infección experimental por Herpesvirus equino 1 en el modelo ratón BALB/c.

ME Bravi, GH Sguazza, MR Scrochi, NA Fuentealba, F Nishida, L Orsini Delgado, P Smaldini, G Docena, CG Barbeito, CI Muglia, CN Zanuzzi, CM Galosi.

XI Congreso Argentino de Virología, Bs As 23-26 de junio de 2015 (Póster).

Estudios patogénicos-moleculares asociados a la infección por *Herpesvirus equino1*.

Bravi ME, Scrochi MR, Fuentealba NA, Sguazza GH, Nishida F, Cid de la Paz V, Corva SG, Barbeito CG, Gimeno EJ, Portiansky EL, Muglia CI, Zanuzzi CN, Galosi CM.

XXIII Jornadas Jóvenes investigadores de AUGM, Universidad Nacional de La Plata, 25-27 de agosto de 2015. (Trabajo completo y Poster)

Pathogenic and immunological study of Equine Herpesvirus 1 infection (EHV-1). New insights in prophylactic strategies.

Bravi ME*; Scrochi MR*, Fuentealba NA*; Sguazza GH, Nishida F, Cid de la Paz V, Gimeno EJ; Portiansky EL, Barbeito CG; Muglia CI; Zanuzzi, CN; Galosi CG. *Similar contribution.

XXVI Congresso Brasileiro de Virologia y X Encontro de Virologia do Mercosul. Florianopolis, Brasil. 11-14 de octubre de 2015.

Scrochi, Bravi y Fuentealba: Comparten autoria. (Resultados del PICT 2011-1123)

Immunological changes in BALB/c pregnant mice model induced by intranasal infection with Equine herpesvirus 1.

ME Bravi, MR Scrochi, NA Fuentealba, GH Sguazza, F Nishida, V Cid de la Paz, SG Corva, EJ Gimeno, EL Portiansky, CG Barbeito, CI Muglia, CN Zanuzzi, CG Galosi.

10th International Equine Infectious Diseases Conference (IEIDC X). Buenos Aires. 4 al 8 de abril de 2016. Póster

Estudio de la patogenia del aborto por Herpes virus equino 1 en el modelo experimental murino BALB/c

ME Bravi, MR Scrochi, NA Fuentealba, GH Sguazza, F Nishida, CG Barbeito, CI Muglia, CN Zanuzzi, CG Galosi.

XXXVI Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Virología. Buenos Aires. 5 y 6 de diciembre de 2016. (Presentación oral).

INDICE DE CONTENIDOS

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.....	XVIII
TÍTULO DE LA TESIS.....	1
PALABRAS CLAVE.....	2
RESUMEN.....	2
<i>KEY WORDS</i>	4
<i>SUMMARY</i>	4
INTRODUCCIÓN.....	6
GENERALIDADES - FAMILIA <i>HERPESVIRIDAE</i>	7
Estructura y propiedades.....	9
Ciclo de replicación	13
ALFAHERPESVIRUS EQUINO 1.....	21
Propiedades específicas de la estructura viral.....	23
Estructura genómica.....	23
Proteínas virales.....	25
Latencia viral y reactivación	28
Patogénesis viral.....	30
Signos clínicos – Histopatología.....	38
Enfermedad respiratoria.....	38
Aborto.....	40

Síndrome neonatal.....	42
Síndrome neurológico.....	43
Infección ocular.....	44
Trastornos en sementales.....	45
Infección vasculotrópica pulmonar.....	45
Epizootiología.....	45
Respuesta inmune.....	50
Diagnóstico.....	52
Prevención y control.....	56
Situación en Argentina.....	59
INMUNOLOGÍA DE LA GESTACIÓN.....	61
Balance Th1/Th2.....	65
Relación Th17/Treg.....	70
Células inmunoreguladoras.....	75
MODELO EXPERIMENTAL PARA EL ESTUDIO DE EHV-1.....	81
Gestación en el modelo murino	87
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	92
Hipótesis.....	93
Objetivo general.....	93
Objetivos específicos.....	93

MATERIALES Y MÉTODOS.....	95
Autorización del proyecto.....	96
Animales de experimentación.....	96
Virus y cultivos celulares.....	98
ETAPA 1: Determinación del tiempo posinfección (pi) para estudiar la respuesta inmune local en la patogenia del aborto.....	100
Inoculación experimental.....	100
Aislamiento viral.....	102
Reacción en cadena de la polimerasa.....	103
Estudio histológico	104
Detección del virus por inmunohistoquímica.....	105
RESULTADOS DE ETAPA 1	106
ETAPA 2: Determinación de cambios a nivel de la respuesta inmune innata y adaptativa que intervengan en la interrupción de la gestación por EHV- 1.....	113
Inoculación experimental.....	113
Evaluación clínica, necropsia y toma de muestra.....	114
Aislamiento viral y PCR.....	115
Estudios moleculares. Determinación de citoquinas.....	115
PCR en tiempo real.....	115

Citometría de flujo.....	118
ELISA.....	119
Estudios histológicos y de inmuno y lectinhistoquímica.....	120
Identificación de células uNK.....	120
Determinación de cambios en la proliferación y muerte celular.....	121
Lectinhistoquímica.....	123
Análisis morfométrico.....	124
RESULTADOS DE ETAPA 2.....	126
DISCUSIÓN.....	143
CONCLUSIONES.....	157
BIBLIOGRAFÍA.....	159
ANEXOS.....	182

Índice de figuras y tablas

Figura 1. Esquema de la organización genómica de los seis grupos establecidos para los miembros de la familia <i>Herpesviridae</i>	10
Figura 2. Estructura genómica general de los miembros del género <i>Varicellovirus</i>	11
Figura 3. Estructura general de un herpesvirus.....	13
Figura 4. Representación esquemática del ciclo de replicación de un herpesvirus.....	14

Figura 5. Mecanismo de replicación por círculo rodante.....	18
Figura 6. Mecanismo de liberación de la partícula viral.....	20
Figura 7. Esquema representativo del estado de latencia y reactivación del <i>alfaherpesvirus equino 1</i>	30
Figura 8. Esquema que ilustra la ruta patogénica del <i>alfaherpesvirus equino 1</i>	33
Figura 9. Modelo esquemático de la ruta propuesta de diseminación de la infección a través de la barrera útero-placentaria.....	36
Figura 10. Rinoneumonitis equina.....	39
Figura 11. Aborto causado por el <i>alfaherpesvirus 1</i>	42
Figura 12. Ciclo de transmisión del <i>alfaherpesvirus equino 1</i>	46
Figura 13. Cambios virales que caracterizan a los linfocitos virémicos y a los latentemente infectados.....	48
Figura 14. Control y prevención de la infección por <i>alfaherpesvirus 1</i>	58
Figura 15. Ratones BALB/c infectados por <i>alfaherpesvirus 1</i>	84
Figura 16. Presencia de tapón mucoso confirmatorio del coito.....	97
Figura 17. Células RK13 normales e infectadas con <i>alfaherpesvirus equino 1</i>	99
Figura 18. Inoculación intranasal de ratones de experimentación.....	101
Figura 19. Diseño experimental de la etapa 1.....	102
Figura 20. Placenta de hembra control negativa a los 6 días pi.....	107
Figura 21. Placenta de hembra infectada, 6 días pi. (HE).....	108

Figura 22. Placenta de hembra infectada día 6 pi (IHQ).....	108
Figura 23. Pulmón de ratonas controles preñadas infectadas y no infectadas y no preñadas infectadas.....	110
Figura 24. Aislamiento viral en monocapas de células RK13.....	111
Figura 25. Útero de hembras BALB/c gestantes.....	126
Figuras 26. Curvas de amplificación de qPCR obtenidas para cada par de primers en útero y placenta de ratonas BALB/c preñadas.....	132
Figura 27. Determinación de transcritos de TNF- α , IFN- γ e IL-10 por qRT-PCR en placentas y úteros de ratonas control e infectadas.....	133
Figura 28. Determinación de transcritos de FOXP3 e IL-4 qRT-PCR en placentas y úteros de ratonas control e infectadas.....	134
Figura 29. Citometría de flujo. Detección de IL-10 (A), TNF- α (B) e IFN- γ (C) en placentas y útero de ratonas control e infectadas.....	135
Figura 30. Técnica de ELISA sándwich para detección de IL-12 en sueros de ratonas control (CD3) e infectadas (ID3).....	136
Figura 31 A. Pulmones del grupo infectado día 3 pi (HE). B. IHQ anti EHV-1 en pulmón.....	138
Figura 32. Imágenes de cortes de placenta (HE).....	139
Figura 33. Morfometría de las áreas de espongiotrofoblasto y laberinto....	140
Figura 34. Evaluación de la proliferación y muerte celular.....	141
Figura 35. Lectinhistoquímica en las placentas de ratonas.....	142
Tabla 1. Función de las glicoproteínas.....	27

Tabla 2. Detección por inmunohistoquímica, PCR y aislamiento viral en pulmón, hígado, bazo y plasma de animales controles positivos de infección.....112

Tabla 3. Secuencia de *primers* específicos utilizados en la qPCR para la determinación de ARNm de cada citoquina.....117

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

°C: grado centígrado

ta: temperatura ambiente

h: horas

min: minutos

seg: segundos

mg: miligramo

ml: mililitro

M: molar

μl: microlitro

μg: microgramo

bp: pares de bases

kb: kilo pares de bases

PM: peso molecular

<: menor que

>: mayor que

≤: menor o igual que

≥: mayor o igual

ABTS: azinodietilbenzotiazol-sulfonato

Ac: anticuerpo

ADN: ácido desoxiribonucleico

ADNc: ADN complementario

Ag: antígeno

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

AV: aislamiento viral

CICUAL: Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio

CD: células dendríticas

CD3: grupo control sometido a eutanasia al 3 posinfección

CD4: grupo control sometido a eutanasia al día 4 posinfección

CF: citometría de flujo

CMH: complejo mayor de histocompatibilidad
DAB: 3-3'diaminobenzidina
DICC₅₀: dosis infectante cultivo de células 50%
DO: densidad óptica
dNTPs: desoxiribonucleótidos
ECP: efecto citopatogénico
EDTA: ácido etilendiaminotetracético
EHV: herpesvirus equino
ELISA: enzimo inmuno ensayo
Foxp3: forkhead box transcription factor
Genes IE: genes inmediatamente tempranos
Genes E: genes tempranos
Genes L: genes tardios
gp: glicoproteína
HE: hematoxilina y eosina
HO-1: hemooxigenasa-1
HSV: Virus herpes simplex
ICTV: Comité Internacional de Taxonomía Viral
ID3: grupo infectado sometido a eutanasia al día 3 posinfección
ID4: grupo infectado sometido a eutanasia al día 4 posinfección
IHQ: inmunohistoquímica
IL: interleuquina
IFN: interferón
IN: intranasal
LIF: factor inhibidor de la leucemia
MHC: complejo mayor de histocompatibilidad
MEM: medio esencial mínimo
MEM-C: MEM de crecimiento
MEM-M: MEM de mantenimiento
MLAp: agregado linfoido mesometrial de la preñez
NK: células natural killer
ORF: marco de lectura abierto
PAS: técnica histoquímica del ácido peryódico de Schiff para mucopolisacáridos

PBMC: células mononucleares de sangre periférica
PBS: solución *buffer* de fosfato
PCNA: antígeno nuclear de proliferación celular
PCR: reacción en cadena de la polimerasa
pi: posinfección
qPCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
RK13: rabbit kidney cells
RORYt: related orphan receptor
RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
SL: solución de lavado
SFB: suero fetal bovino
SNC: Sistema nervioso central
SPF: Specific Pathogen Free
TGF: factor de crecimiento transformante
Th: linfocitos T colaboradores (T helper)
TNF: factor de necrosis tumoral
Treg: linfocitos T reguladores
UFP: unidades fetoplacentarias
uNK: células natural killer uterinas
UL: región única larga
US: región única corta
VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular
VN: neutralización viral

RESPUESTA INMUNE LOCAL EN LA PATOGENIA DEL ABORTO INDUCIDO POR HERPESVIRUS EQUINO 1



PALABRAS CLAVE

Aborto, *Alfaherpesvirus equino 1*, Modelo murino, Respuesta inmune.

RESUMEN

El *alfaherpesvirus equino 1* produce alteraciones reproductivas que ocasionan importantes pérdidas económicas, además de las que suceden a nivel respiratorio y nervioso. En esta tesis se utilizó el modelo murino BALB/c para estudiar algunos cambios en el útero y las placentas de ratonas preñadas y experimentalmente infectadas que pudieran producir la pérdida de continuidad del *conceptus*. Se describieron las lesiones en los pulmones, el útero y las placentas y se estudiaron los cambios vasculares y en la proliferación y muerte celular por inmunohistoquímica. Se analizaron los niveles en la expresión de algunas citoquinas por qPCR, citometría de flujo y por ELISA. Las ratonas infectadas manifestaron signos clínicos respiratorios y en sus pulmones lesiones histopatológicas típicas, con aislamiento viral y detección de ADN positivos. En las placentas infectadas el aislamiento viral y detección de ADN fueron negativos. Sin embargo, presentaron congestión vascular, ocasionales trombos en pequeños vasos de las capas de espongiotrofoblasto y decidua, aumento en el área del laberinto, y reducción significativa en el endotelio capilar fetal. También se redujo significativamente la proliferación celular, mientras que la apoptosis fue significativamente mayor. La regulación local de la expresión de IL-10, TNF- α , IFN- γ , Foxp3 e

IL-4 también difirió en el útero y las placentas del grupo infectado con respecto al control. Hubo un fuerte incremento de la respuesta Th1, mayormente representado por IFN- γ , acompañada por una respuesta Th2 tolerogénica, cuyo fin podría ser restaurar el balance homeostático ante la infección. Los datos obtenidos permiten afirmar que se producen cambios celulares y moleculares a nivel de la respuesta inmune local debido a la infección. La comprensión del impacto inmunológico de la infección sistémica y local por el virus en el modelo murino ayudará a abordar estudios en equinos para mejorar las estrategias profilácticas y terapéuticas.

KEY WORDS

Abortion, *Equid alphaherpesvirus 1*, Immune response, Murine model.

SUMMARY

Equid alphaherpesvirus 1 causes respiratory, nervous and reproductive disorders, being the latter those that produce high economic losses in Argentina. In this thesis, the BALB/c mice model was used to study some changes in the uterus and placentas of pregnant and experimentally infected mice that could explain the loss of the conceptus. We described the histopathological lesions present in the lungs, uteri and placentas of the infected mice, in addition to placental vascular alterations, and studied cellular proliferation and death changes by immunohistochemistry. In addition, the expression of some cytokines was analyzed by qPCR, flow cytometry and ELISA. The infected mice showed respiratory clinical signs, and histopathological lesions of EHV-1 infection in their lungs, which were also positive to virus isolation and DNA detection. On the other hand, virus isolation and DNA detection were negative in the infected placentas. However, vascular congestion, occasional thrombi in small vessels of spongiotrophoblast layers and decidua, an increase in the labyrinth area, and a significant reduction in fetal capillary endothelium surface were described in them. Besides, cell proliferation was significantly reduced whereas apoptosis was increased. Local expression of IL-10, TNF- α , IFN- γ , Foxp3 and IL-4 also

differed in the uteri and the placentas of infected group in comparison to control mice. There was a strong increase in Th1 response, mostly represented by IFN- γ , but also a tolerogenic Th2 response which may be used to restore the immunological homeostasis in response to infection. Here, we have shown changes in the local immune response induced by the infection. The understanding of the immunological impact of systemic and local EHV-1 infection in the murine model will help to address future studies in the natural host to improve prophylactic and therapeutic strategies.

INTRODUCCIÓN

GENERALIDADES

FAMILIA *HERPESVIRIDAE*

El orden *Herpesvirales* está dividido en tres familias que abarcan varias especies virales que han sido bien caracterizadas (ICTV: <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>). La familia *Alloherpesviridae* comprende virus de peces y ranas, la familia *Malacoherpesviridae* incluye solamente virus de moluscos marinos y la familia *Herpesviridae*, que es la más ampliamente distribuida en la naturaleza, contiene solamente especies que afectan a mamíferos, aves y reptiles (Fauquet y col., 2005).

La familia *Herpesviridae* está constituida por un grupo de virus morfológicamente similares que, en su mayoría, son capaces de inducir infecciones latentes en los huéspedes. Los herpesvirus se clasifican de acuerdo a sus propiedades biológicas en tres subfamilias: *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* y *Gammaherpesvirinae* (Davison y col., 2009). Esta clasificación se basa en el tropismo celular del virus, el tipo de crecimiento en cultivos celulares, el efecto citopático que producen y los sitios de latencia.

A continuación se describen las principales características de la familia *Herpesviridae*, teniendo en cuenta la clasificación en subfamilias y los géneros que las integran. Actualmente las especies han sido red denominadas de manera que antes del vocablo herpesvirus se antepone el prefijo que indica a la subfamilia a la cual pertenece. A modo de ejemplo se señala que

el anteriormente denominado *Equid herpesvirus 1* ahora se red denominó como *Equid alphaherpesvirus 1* (EHV-1). Este nombre será utilizado de ahora en más en todo este trabajo de tesis.

Subfamilia Alphaherpesvirinae: presenta un amplio rango de hospedadores naturales, un ciclo reproductivo breve, un desarrollo rápido en cultivos celulares, una rápida diseminación en cultivo de tejidos y una gran eficiencia en la destrucción de células infectadas, por lo tanto el efecto citopático que produce es lítico. Establecen latencia en ganglios neurales sensoriales. Se clasifican en seis géneros: **Simplexvirus** (ej.: *Human alphaherpesvirus 1* y 2), **Varicellovirus** (ej.: EHV-1), **Mardivirus** (ej.: *Gallid alphaherpesvirus 2* y 3), **Iltoivirus** (ej.: *Gallid alphaherpesvirus 1*), **Scutavirus** (representado por *Chelonid alphaherpesvirus 5*) y un género aún sin nombrar (representado por *Chelonid alphaherpesvirus 6*).

Subfamilia Betaherpesvirinae: posee un rango de hospedadores restringido, un ciclo reproductivo prolongado y su desarrollo en los cultivos celulares es lento. Además, puede establecer latencia en los riñones, las glándulas salivales y los endotelios vasculares. Los géneros incluidos en esta subfamilia son: **Cytomegalovirus** (ej.: *Human betaherpesvirus 5*), **Muromegalovirus** (ej.: *Murid betaherpesvirus 1* y 2), **Roseolovirus** (ej.: *Human betaherpesvirus 6^a* y 7), **Proboscivirus** (ej.: *Elephantid betaherpesvirus 1*) y un género aun no denominado que comprende tres integrantes, entre ellos al *Suid betaherpesvirus 2*.

Subfamilia Gammaherpesvirinae: el rango de hospedadores está limitado a la familia u orden a la que pertenece el hospedador natural. Se replican *in vitro* en células linfoblásticas y algunos producen lisis en células epitelioides y fibroblastos. Son específicos de linfocitos T y B y se ha demostrado que establecen latencia en tejidos linfoides. Comprende los géneros **Lymphocryptovirus** (ej.: *Human gammaherpesvirus 4*), **Rhadinovirus** (ej.: *Bovine gammaherpesvirus 4*), **Macavirus** (ej.: *Bovine gammaherpesvirus 6* y *Ovine gammaherpesvirus 2*), **Percavirus** ej.: *Equid gammaherpesvirus 2* y 5) y un género sin nombre asignado que incluye tres integrantes, entre ellos el *Equid gammaherpesvirus 7* (Roizman y col., 1985; Fauquet y col., 2005; ICTV: <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>).

Estructura y propiedades de los herpesvirus

Desde el punto de vista estructural, la partícula viral está formada por una única molécula de ADN lineal de doble cadena, de tamaño variable entre 124 y 235 pares de kilobases (kbp), capaz de codificar entre 30-35 proteínas estructurales y más de 70 proteínas en la célula infectada y que se encuentra enrollada alrededor de una estructura proteica toroidal central. Este genoma posee secuencias repetidas internas y terminales que hacen variar su tamaño en hasta 10 kb. En base a la presencia y a la disposición de aquellas secuencias repetidas internas y terminales, existen 6 tipos genómicos (de A

hasta F). El estudio de organización del mismo otorga un criterio de clasificación diferente, el cual es ejemplificado en la **figura 1**.

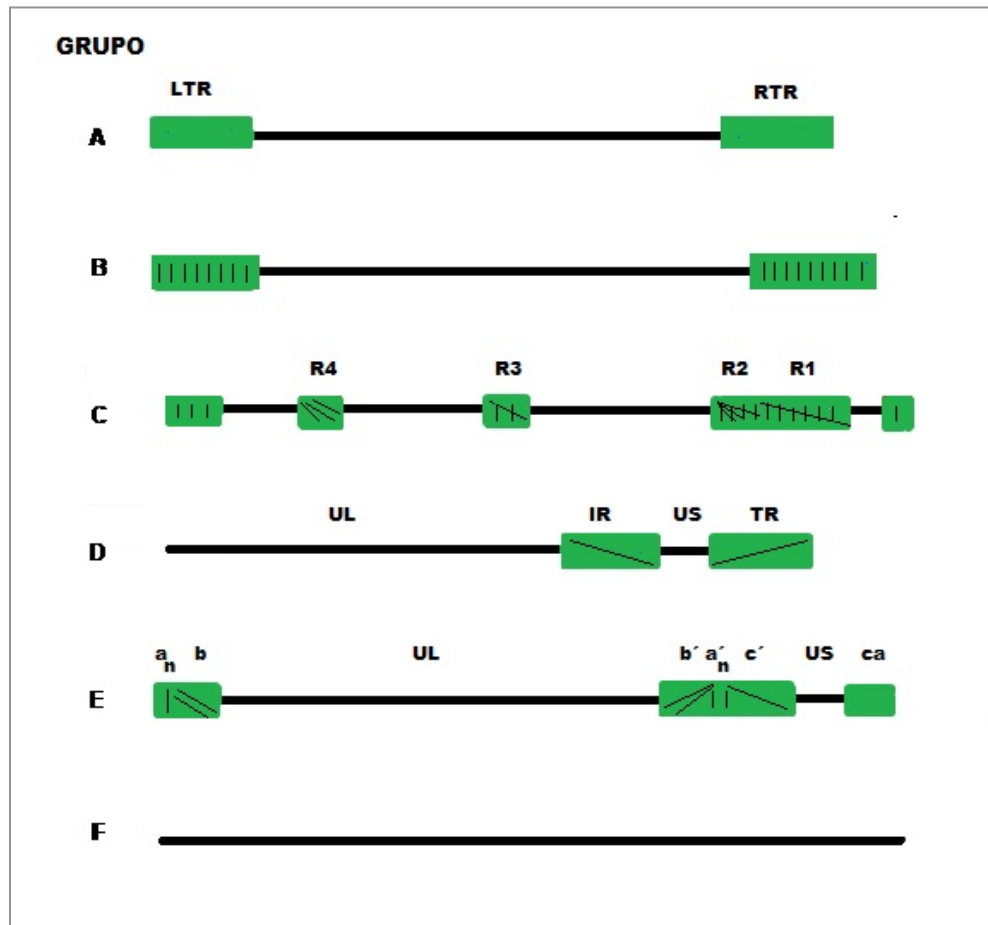


Figura 1. Esquema de la organización genómica de los seis grupos establecidos para los miembros de la familia *Herpesviridae*. Las líneas horizontales representan regiones únicas o casi únicas, largas (UL) o cortas (US). Las regiones repetitivas están representadas por rectángulos y barras verticales (||||). Las líneas oblicuas (↗) indican la orientación de las secuencias. En el grupo “A” las regiones repetitivas se designan repeticiones terminales izquierda (LTR) y derecha (RTR). En el grupo “B”, las secuencias terminales están reiteradas en varias ocasiones en ambos extremos y el número de repeticiones puede ser diferente en cada extremo. Para el grupo “C”, R1 a R4 indican repeticiones internas. En el grupo “D” se diferencian las repeticiones internas (IR) de las terminales (TR). El genoma del grupo “E” consiste en dos regiones: 1) UL limitada por “n” copias de la secuencia “a” (a_n) próxima a la secuencia denominada “b”, y por una secuencia repetida “ a'_n ” próxima a la secuencia denominada “c”; y 2) UL flanqueada por “ $a'_n c'$ ” y “ca”. Las terminaciones del grupo “F” no han sido descritas. (Modificado a partir de Roizman y col., 1992).

El EHV-1 posee un genoma de tipo D constituido por dos regiones únicas de diferente tamaño, una larga (UL) y otra corta (US). La región corta se encuentra flanqueada por una repetición invertida interna (IRs) y por una repetición terminal (TRs) (**Figura 2**) ([Roizman y col., 1992](#)). En cada extremo del genoma sobresale un corto segmento de ADN de simple cadena. Los extremos de ADN de simple cadena son mutuamente complementarios, esto permite que se forme una molécula de ADN circular una vez ingresado el mismo al núcleo de la célula.

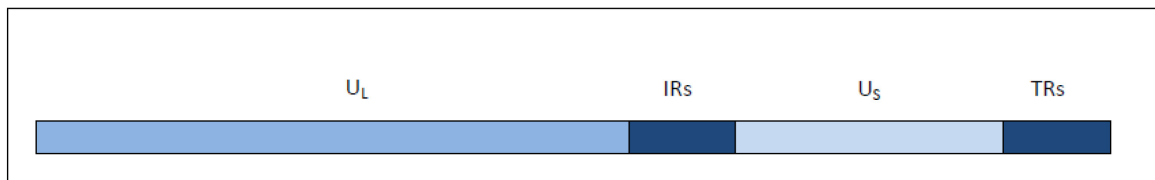


Figura 2. Estructura genómica general de los miembros del género *Varicellovirus*.

Rodeando al genoma se encuentra la cápside de simetría icosaédrica, constituida por 162 capsómeros de los cuales 150 son hexámeros y 12 (ubicados en los vértices) son pentámeros. Alrededor de la nucleocápside se presenta el tegumento, una capa fibrosa y asimétrica, compuesta de glicoproteínas (gp), lipoproteínas y proteínas con actividad enzimática, que son liberadas al citoplasma de la célula huésped cuando se produce la fusión de la envoltura viral con la membrana plasmática. En general, estas proteínas se encargan de tomar el control de la maquinaria molecular de la

célula. Un ejemplo es la proteína codificada por el gen *UL41*, que por su actividad ARNasa cataliza la degradación del ARNm de la célula (Feng, 1996).

Los herpesvirus poseen una envoltura externa, lipoproteica y trilaminar que presenta proyecciones glicoproteicas hacia el exterior llamadas espículas o peplómeros y que son necesarias para la replicación viral, debido a que intervienen en el proceso de adsorción y penetración a la célula huésped. Por otro lado, son determinantes críticos del tropismo celular, de la propagación del virus de una célula a otra, de la patogenia y de la inducción de la respuesta inmune humoral.

El tamaño del virión puede variar de 150 a 250 nanómetros (nm) debido a pleomorfismo de la envoltura. Estos virus poseen relativa inestabilidad a la temperatura ambiente (t_a), se inactivan a $pH \leq 3$ y ≥ 9 , y con solventes orgánicos y desinfectantes comunes (Roizman y col., 1992).

La **figura 3** sintetiza la estructura general de un herpesvirus.

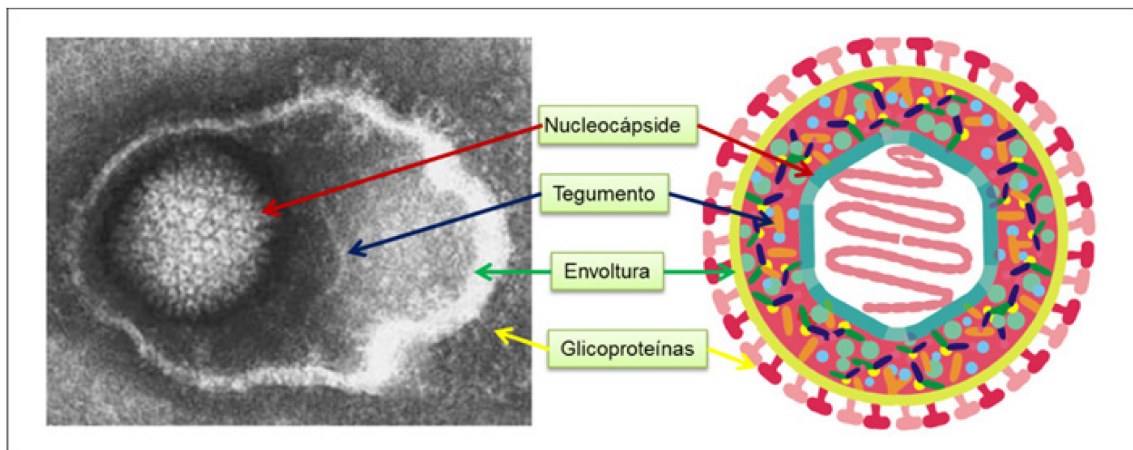


Figura 3. Estructura general de un herpesvirus. La imagen de microscopía electrónica (izquierda) refleja las estructuras señaladas en el gráfico del lado derecho: la nucleocápside de simetría icosaédrica que envuelve al ADN, el tegumento representado por pequeñas estructuras en diferentes colores y, las proteínas y glicoproteínas de la envoltura dibujadas como proyecciones (modificado a partir de [Pomeranz y col., 2005](#)).

Ciclo de replicación de los herpesvirus

Lo distintos herpesvirus comparten etapas similares de infección, que solo varían en la duración del ciclo (entre 18 a 96 horas –h–), de acuerdo a la subfamilia a la que pertenezcan ([Watson, 1973](#)). A continuación se describen brevemente las etapas del ciclo de replicación tomando como base al prototipo HSV-1 ([Roizman y col., 1985](#)). La **figura 4** esquematiza el proceso de replicación de los herpesvirus.

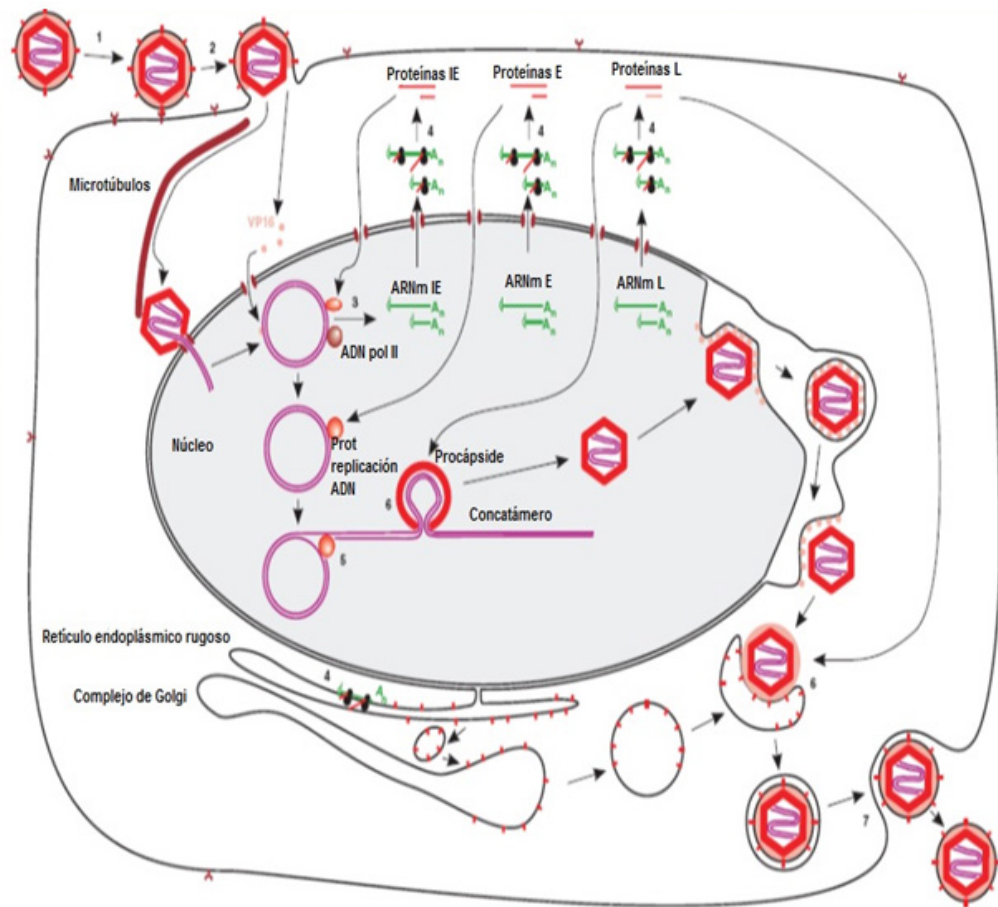


Figura 4. Representación esquemática del ciclo de replicación de un herpesvirus: (1) Adsorción. (2) Penetración. (3) Transcripción. (4) Traducción de proteínas inmediatamente tempranas – IE-, tempranas – E- y tardías – L- . (5) Replicación. (6) Ensamblaje. (7) Liberación. (Modificado de *Virology Principles and Applications*, Carter y Saunders, 2007).

Adsorción: en la mayoría de los alfa herpesvirus la adhesión comienza con la interacción de alguna glicoproteína (gp) de la envoltura viral al heparán sulfato de la matriz extracelular (Spear y col., 2003), esta unión es lábil hasta que comienzan a participar otras gp en el proceso de entrada. Luego se produce la unión al receptor del virus propiamente dicho presente en la célula

blanco. En muchos casos este receptor es una nectina de la membrana celular (Flint y col., 2004).

Penetración: la entrada del virus a la célula se produce generalmente por fusión de la envoltura viral con la membrana celular, aunque en algunos casos puede ser por endocitosis seguida de la unión de la envoltura con la membrana del endosoma. En cualquiera de los dos casos, las proteínas del tegumento y la nucleocápside viral son liberadas al citoplasma.

Decapsidación: luego de la fusión se produce en el citoplasma la liberación del ADN viral, que es transportado por medio de los microtúbulos hacia la proximidad de un poro nuclear, en donde es liberado y traslocado al interior del núcleo. La proteína del tegumento asociada a la cápside (UL34 del HSV) se une a la dineína de los microtúbulos y cataliza el desplazamiento hacia el núcleo (Ye y col., 2000). Una vez en el interior del mismo la molécula de ADN se une covalentemente por sus extremos formando un polímero circular que se asocia a histonas celulares (Garber y col., 1993; Carter y Saunder, 2007). Esta secuencia de eventos se sucede gracias a la acción de todos los componentes del virión que protegen y facilitan la entrada del ADN viral y frenan la síntesis de macromoléculas de la célula hospedadora.

Transcripción: la transcripción del ADN viral comienza en el núcleo por acción de la enzima ARN polimerasa II de la célula hospedadora. La expresión de los genes está regulada por un sistema de “*on-off*” que activa e interrumpe la lectura secuencial de los genes. De esta manera, se pueden distinguir tres grupos de genes dependiendo del momento de la infección en

que se expresan: los genes α o genes inmediatos tempranos (*immediate early* -IE-), los genes β o genes tempranos (*early* -E-) y los genes γ o genes tardíos (*late* -L-) ([Gray y col, 1987](#)). Los genes α son los primeros en transcribirse y tienen como factor de transcripción a la proteína del tegumento VP16. Ésta se asocia al ADN viral y a otras proteínas iniciadoras de la transcripción de origen celular, que en conjunto forman un complejo que recluta a la ARN polimerasa II para iniciar la transcripción. Los genes α codifican factores de transcripción que regulan la expresión de los genes β y γ , aunque algunas de estas proteínas también tienen otras funciones. Las proteínas codificadas por los genes β presentan su pico máximo de expresión entre las 4 y 8 h posinfección (pi) y están implicadas en el metabolismo de los nucleótidos y en los eventos ligados a la replicación del ADN viral. Las proteínas estructurales codificadas por los genes γ (entre los cuales tenemos a los γ 1 -tardíos precoces- y γ 2 -tardíos propiamente dichos-) se producen en gran cantidad en el citosol o en retículo endoplasmático. Algunas de ellas migran hacia el núcleo donde se ensamblarán para formar las nuevas cápsides. Los genes γ codifican para las gp virales esenciales para lograr una infección productiva en tejidos, ya que están involucradas en la entrada de las partículas virales extracelulares a las células, como así también para otras gp consideradas como no esenciales ([Davison y col., 2009](#)).

Replicación: varias copias de la proteína viral de unión al origen de la replicación se unen a uno de los tres sitios *Ori* (origen de replicación) donde actúan como una helicasa separando las hebras del ADN viral. Las proteínas de unión a ADN de simple cadena mantienen las dos cadenas de ADN separadas, permitiendo la unión de un complejo de tres proteínas al sitio *Ori*. Este complejo forma una horquilla de replicación gracias a su actividad helicasa. Este mismo complejo también tiene actividad primasa y sintetiza un corto fragmento de ARN que hace de cebador o *primer* para que la ADN polimerasa unida al factor de procesividad de la polimerasa comience la síntesis de la cadena líder. En la cadena complementaria, las primasas se encargan de sintetizar cortos fragmentos de ARN que servirán de cebador para la síntesis de los fragmentos de Okazaki ([Carter, 2007](#)). El conocimiento actual sobre la replicación de los herpesvirus, a cargo de una ADN polimerasa específica codificada por el virus indica que es, en un comienzo, de tipo θ , pero que luego cambia a un tipo de replicación σ , también conocida como círculo rodante, a partir de la cual se forman largas cadenas de concatámeros de ADN viral que son clivadas en sitios de señal de empaquetamiento e integradas en la nucleocápside madura (**Figura 5**).

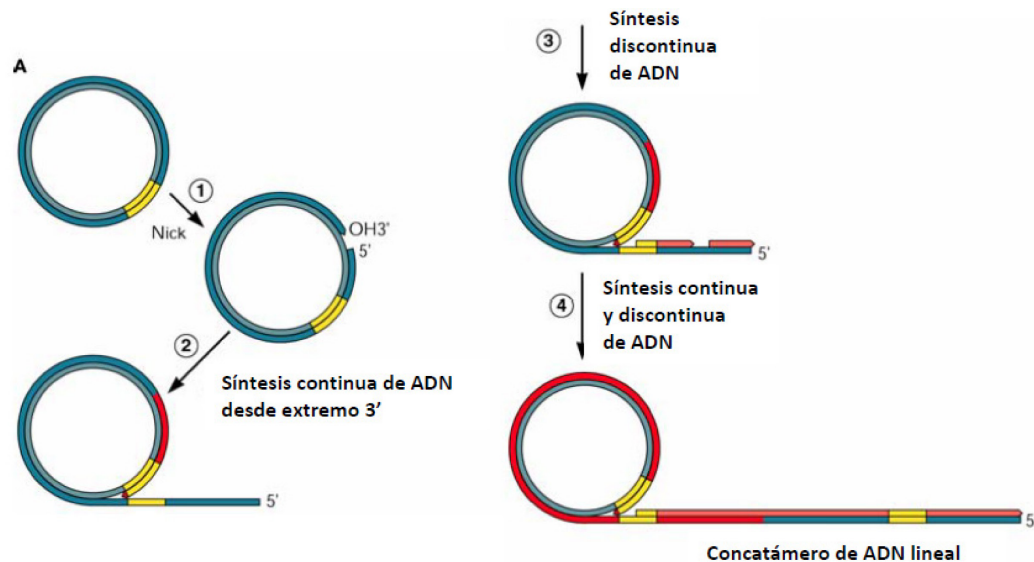


Figura 5. Mecanismo de replicación por círculo rodante (Modificado de [Flint y col., 2004](#)).

Ensamble, maduración y liberación de viriones desde la célula: las gp de la envoltura son sintetizadas en el retículo endoplasmático rugoso y son transportadas al complejo de Golgi. Las proteínas estructurales de la cápside son acumuladas en el núcleo en el compartimiento nuclear de replicación, donde se unen para formar una procápside que es algo más redondeada que una cápside y cuya estabilidad es mantenida por proteínas de armadura. Estas últimas son degradadas durante la maduración de la cápside por una proteasa de origen viral. Durante el ensamble, cada procápside adquiere un segmento de ADN del concatámero que contiene una única copia del genoma del virus. Cada una de las copias del genoma está marcada en el concatámero por una señal de ensamblaje. Una copia única de ADN viral

ingresa a la cápside por el canal portal, probablemente formado por la proteína codificada por el gen *UL6*. Hay evidencias de que el ADN utiliza este portal tanto en el ensamblaje como durante su liberación.

La nucleocápside se asocia a la cara interna de la envoltura nuclear, alterada por la replicación viral, y en esa localización adquiere el tegumento y la envoltura para poder ser liberada como una partícula viral completa. Los mecanismos pueden sintetizarse de la siguiente manera:

- La nucleocápside sale a través de la membrana nuclear interna en una vesícula, obteniendo una envoltura transitoria (**Figura 6A**).
- Esta envoltura transitoria se fusiona con la membrana nuclear externa y en consecuencia se libera la nucleocápside al citoplasma (**Figura 6A**).
- En el citoplasma la nucleocápside se uniría con las proteínas del tegumento. Se sabe que el tegumento no es una matriz proteica amorfa; por el contrario, es una estructura ordenada bastante regular con una porción interna y una externa. La superficie externa de la nucleocápside tendría un rol fundamental en ordenar la agregación de las proteínas tegumentarias. La nucleocápside y el tegumento penetran en una vesícula proveniente del complejo de Golgi (**Figura 6B**). En esta **maduración** la partícula viral obtendría su envoltura definitiva contando con todas las gp virales, y quedaría encerrada en una vesícula (**Figura 6C**). Según este mecanismo, las gp solo serían expresadas en la membrana de vesículas internas de la célula. Sin embargo, se sabe también que las gp son transportadas a la membrana plasmática de la célula, donde intervienen en distintos procesos

como la fusión de células y la consecuente formación de sincitios, así como en la propagación de la infección de célula a célula.

- Por último, la vesícula con el virión se fusiona con la membrana plasmática y se produce la **liberación** al medio extracelular por exocitosis o citólisis de la célula (**Figura 6D**) ([Granzow y col., 2001](#)).

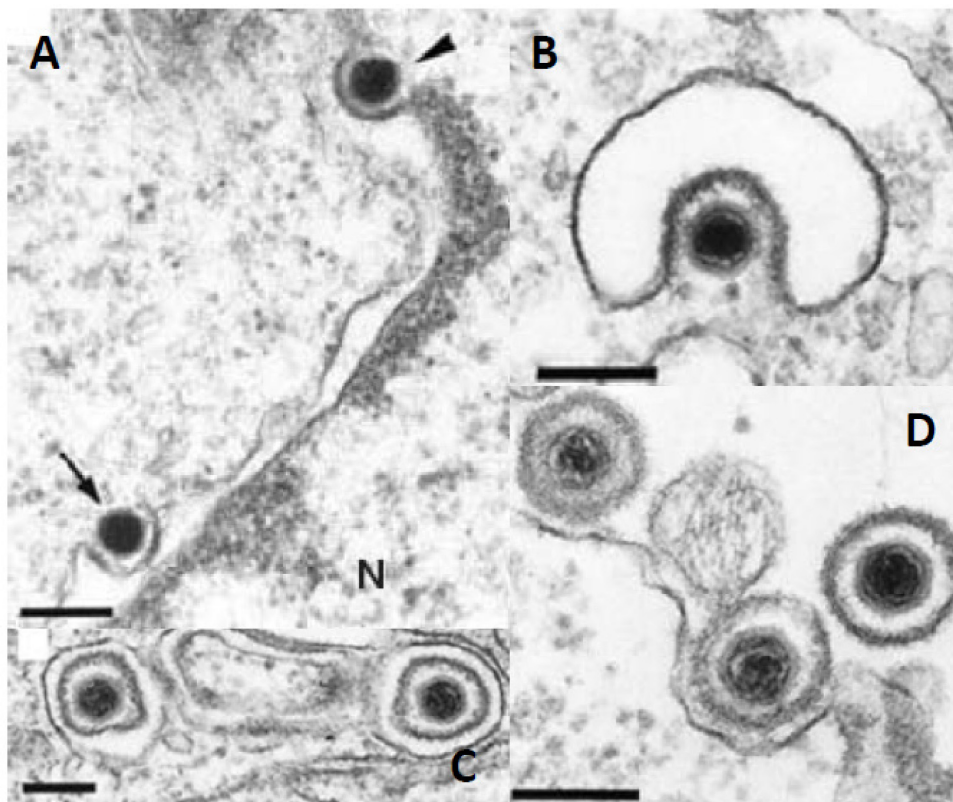


Figura 6: Mecanismo de liberación de la partícula viral. **A)** La partícula superior se encuentra atravesando la membrana nuclear interna. La otra partícula está siendo liberada en el citoplasma. La barra representa 200 nm. **B)** Una nucleocápside con su tegumento es envuelta por una vesícula proveniente del complejo de Golgi. La barra representa 150 nm. **C)** Se muestran partículas virales maduras en el interior de vesículas. La barra representa 150 nm. **D)** Se observan viriones abandonando el citoplasma. La barra representa 150 nm (Modificado a partir de [Carter y col., 2007](#)).

ALFAHERPESVIRUS EQUINO 1

Actualmente se han identificado varios herpesvirus que infectan a los miembros de la *Familia Equidae*: seis de ellos son alfaherpesvirus y tres son gamaherpesvirus. Dentro de los alfaherpesvirus equinos (EHV) se encuentran el EHV-1, EHV-3, EHV-4, EHV-8 y EHV-9. Todos, a excepción del EHV-3 (virus del exantema coital equino) son patógenos respiratorios. Entre los gamaherpesvirus se hallan el EHV-2, el EHV-5 y el EHV-7 (aún sin género asignado). Otros virus relacionados al EHV-1 fueron aislados a partir de un feto abortado de un onagro (*Equushemionus onager*) y de una cebrá (*Equus grevyi*) ([Patel y Heldens, 2005](#); [Davison y col., 2009](#); ICTV).

El EHV-1 y el EHV-4 muestran una considerable homología genética y reacción cruzada desde el punto de vista antigénico. EHV-2 y EHV-5 sólo comparten algunos determinantes antigénicos ([Crabb y Studdert, 1995](#)). El estudio genómico del EHV-9, basado en las secuencias de ADN que codifican para gB y gG, indica que posee 95 y 60 % de similitud con el EHV-1 y el EHV-4, respectivamente.

Sobre la base de la estrecha relación genética y antigénica entre el EHV-1 y los alfaherpesvirus aislados a partir de burros, cebras y asnos salvajes y, debido al potencial patogénico de EHV-1, se supone que éste fue adquirido por el antepasado del caballo moderno y que, evolutivamente, en la transmisión reciente a otras especies, todavía no ha alcanzado, desde el

punto de vista patogénico, el equilibrio completo del virus con sus nuevos huéspedes ([Crabb y Studert, 1990](#)).

Experimentalmente, se demostró que el EHV-2 está asociado con rinitis y conjuntivitis aunque también se demostró su participación en el aborto equino ([Galosi y col., 2005](#)).

A pesar de ser altamente prevalentes a nivel mundial, EHV-2 y EHV-3 son considerados de menor importancia económica y veterinaria comparados con EHV-1 y EHV-4. Los datos de prevalencia para EHV-5 son escasos ([Patel y Heldens, 2005](#)). Como todos los miembros de la familia *Herpesviridae*, EHV-1 y EHV-4 son filogenéticamente antiguos y, durante su prolongada co-evolución con el equino, se han convertido exitosamente en parásitos virales. Tal éxito de EHV-1 y EHV-4 como huéspedes permanentes del equino depende de la posesión, por los dos herpesvirus, de una combinación de características biológicas únicas.

El EHV-1 es un patógeno de distribución mundial que afecta a todos los équidos ([Slater y col, 2007](#)). La infección por EHV-1 sigue siendo considerada la más importante dentro de las producidas por herpesvirus debido a su diversidad de presentaciones clínicas y a su potencial de causar grandes pérdidas económicas en la industria equina ([Dunowska, 2014](#)). Este impacto negativo se debe generalmente a su propiedad de inducir abortos y muertes neonatales, enfermedad respiratoria (rinoneumonitis equina [RNE]) y desórdenes neurológicos ([Allen y col., 2004](#)).

PROPIEDADES ESPECÍFICAS DE LA ESTRUCTURA VIRAL

Estructura genómica

Como todos los herpesvirus, el EHV-1 posee una molécula de ADN lineal de doble cadena, de 150,2 kb y 56,7% de G+C. El PM es de $9,2 \times 10^7$ Da, y su densidad de flotación en sucrosa y tartrato de potasio es de 1,18 g/cm³ (Roizman y col., 1992; Allen y col., 2004). Es lábil en el medio ambiente y se inactiva rápidamente por solventes lipídicos, detergentes, calor y desinfectantes comunes de uso veterinario. Su genoma es del tipo “D”, posee una región UL de 112.870 bp flanqueada por secuencias repetidas (TR_L/IR_L) de 32 y 27 bp, y se encuentra ligada a la región US de 11.861 bp, que es flanqueada por repeticiones invertidas largas (TR_S/IR_S) de 12.714 y 10.178 bp. Por la inversión del fragmento US respecto al UL pueden generarse dos tipos isoméricos de ADN. Las regiones codificantes de EHV-1 contienen más de 99 codones. La secuenciación genómica realizada por Telford y col. (1992) demostró que los marcos abiertos de lectura (ORF) están organizados de manera compacta en ambas cadenas, sin solapamiento extensivo y con las regiones terminales cerca de los sitios candidatos a poliadenilación, o están transcritos como miembros de familias 3' coterminales. Existen 76 ORFs, de los cuales 4 (#64, 65, 66 y 67), ubicados en las secuencias repetidas que flanquean US, se encuentran duplicados. Los productos de estos 76 genes se agrupan dentro de cuatro categorías:

- 1) polipéptidos estructurales de la nucleocápside y del tegumento,

- 2) gps de transmembrana asociadas con la envoltura viral,
- 3) proteínas transactivadoras y reguladoras de la transcripción, y
- 4) proteínas necesarias para la replicación viral, el ensamblaje, la morfogénesis del virión y el egreso de los viriones de la célula huésped.

Existen 5 genes (#1, 2, 67, 71 y 75) que no poseen homología con ningún segmento génico de otro alfa herpesvirus, y cuya función no es totalmente conocida, pero se supone que sus productos juegan un papel muy importante en la adaptación del virus al equino, su huésped natural. El genoma de EHV-1 contiene además cinco regiones cortas repetitivas, en *tándem* y no codificantes: a) la primera región mide aproximadamente 1 kbp y está ubicada, de acuerdo al esquema convencional, en el extremo derecho del genoma viral; b) la segunda región, de un 1 kbp se localiza entre el ORF 39 y el ORF 40; c) la tercera región posee aproximadamente 1,5 kbp y está localizada entre el ORF 62 y ORF 63; d) la cuarta región de 2 kbp se localiza entre el ORF 63 y ORF 64 en la unión U_L/IR_S ; e) la quinta región de 2,5 kb se encuentra ubicada entre el ORF 64 y ORF 65. Estas regiones varían entre cepas virales y entre diferentes clones de la misma cepa (Audonnet y col., 1990; Telford y col., 1992; Allen y col., 2004; Ibrahim y col., 2004).

A través del análisis de los fragmentos de restricción del ADN se identificaron más de 16 electroferotipos de EHV-1, y luego se determinó la existencia de dos tipos genómicos: el EHV-1P y el EHV-1B (Allen y col., 1983; Allen y col., 1985). El EHV-1P difiere del EHV-1B en el número de

sitios de reconocimiento de la enzima de restricción *Bam*HI en las regiones IR_S y TR_S: el EHV-1P tiene dos sitios de corte en cada región IR_S y TR_S, mientras que EHV-1B tiene solo un sitio en cada una de esas regiones. Este electroferotipo 1B fue reportado por primera vez en Estados Unidos en 1964, luego comenzó a incrementarse su circulación y actualmente su distribución es mundial ([Allen y col., 1983](#); [Martinez y col., 2006](#)). En relación a otras propiedades del genoma, trabajos recientes de secuenciación han permitido demostrar que las cepas de EHV-1 que producen el síndrome neurológico presentan una mutación puntual en la posición 2254 de la región que codifica para la ADN polimerasa (ORF 30): en esa posición las cepas neuropatogénicas poseen guanina (G₂₂₅₄), mientras que las no neuropatogénicas (“*wild type*”) poseen adenina (A₂₂₅₄) ([Nugent y col., 2006](#)). Actualmente continúan los estudios genómicos orientados a establecer la relación entre la virulencia diferencial de las cepas y el tipo de signo clínico producido ([Osterrieder y col., 1996](#); [Gupta y col., 2005](#); [Ghanem y col., 2007](#); [Fuentealba y col., 2011](#)).

Proteínas virales

El genoma del virus codifica alrededor de 30 proteínas, de las cuales seis (ORFs 22, 25, 3. 42, 43 y 56) forman la estructura del core y la nucleocápside, y otras doce (ORFs 11, 12, 13, 14, 15, 23, 24, 40, 46, 49, 51 y 76) se encuentran formando parte del tegumento. Constituyendo la envoltura viral hay al menos 12 proteínas glicosiladas, entre las cuales las

más abundantes son: a) la proteína mayor de la cápside (ORF 42), b) la proteína del tegumento codificada por el ORF 13 (g10) y c) cinco gp denominadas gB, gC, gD, gM y g300. Estas gp de la envoltura juegan un rol fundamental en la replicación (específicamente en la entrada y penetración del virus a la célula huésped), además son determinantes críticos del tropismo, de la propagación del virus de célula a célula, de la patogénesis y de la inducción de la respuesta inmune. Se ha demostrado que son importantes inmunógenos y sirven de blanco en la neutralización por anticuerpos (Ac), la gB, gC y gD son los antígenos más inmunodominantes ([Allen y Bryans, 1986](#); [Molinková y col., 2008](#)).

Las gB, gD, gH, gL y gK son esenciales para la replicación del virus mientras que las gC, gE, gG, gI, gM y g300 son clasificadas como no esenciales. Sin embargo, la delección experimental de los genes que codifican para estas últimas gp genera reducción de la virulencia de las cepas ([Matsumura y col., 1996](#); [Matsumura y col., 1998](#); [Csellner y col., 2000](#)). La **tabla 1** resume la función de cada una de las gp del EHV-1.

Tabla 1. Función de las glicoproteínas (gp) del *Herpesvirus equino 1* (EHV-1). (Extraída de Osterrieder y Van de Walle, 2010).

Glicoproteína	Esencial	Función
gB	Si	Penetración y propagación entre las células
gC	No	Adsorción y egreso de la célula
gD	Si	Penetración y pasaje de célula a célula. Actúa en la vía de penetración endocítica
gE	No	Pasaje de célula a célula
gG	No	Unión a quemoquinas
gH	Probable	Desconocida
gI	No	Pasaje de célula a célula
gK	Probable	Pasaje de célula a célula y egreso
gL	Probable	Desconocida
gM	No	Penetración y pasaje de célula a célula
gN	No	Procesamiento de Gm
g2	No	Factor de virulencia. Rol en la inflamación

Dentro de las células infectadas por EHV-1 se identificaron otras proteínas con función regulatoria (transactivadoras, reguladoras de la transcripción), enzimas replicativas (ADN polimerasa, ribonucleótido reductasa, helicasa-primasa, timidina-quinasa) y proteínas con acción en la morfogénesis y egreso del virión de la célula huésped (Mc Geoch y col., 1993; 2006).

Latencia viral y reactivación

Bajo ciertas circunstancias, y en algunos tipos específicos de células, el ingreso del virus puede conducir a un estado de latencia. Este es un estado de reposo en el que no hay replicación del genoma viral en la célula ni traducción de proteínas, el genoma es silenciado casi completamente con excepción de unos genes denominados *LAT* (*Latency associated transcripts*). Estos genes son transcriptos pero no traducidos, y son el único vestigio de expresión génica viral en las células infectadas en las que el virus entra en latencia. Uno de ellos tiene funciones antiapoptóticas por mecanismos no del todo comprendidos. El estado de latencia funciona como un refugio del virus frente al sistema inmune, ya que el genoma viral no está produciendo virus infeccioso y queda “invisible” para ser detectado por dicho sistema. En particular, el EHV-1 entra en latencia en el tejido linfoide (en caballo en linfocitos T CD5+ CD8+) ([Smith, 1998](#)) y en neuronas del nervio trigémino ([Baxi, 1995](#)). Bajo ciertas circunstancias como las que generan estados de inmunosupresión, este genoma silenciado puede activarse y comenzar la producción de proteínas virales. En forma experimental, se logró reactivar el genoma viral de EHV-1, tanto en el hospedador natural como en un modelo murino, a partir de la administración de corticosteroides y fue posible aislar virus principalmente de leucocitos de sangre periférica y también de los exudados nasales. Por lo tanto, la reactivación local puede ocurrir con o sin infección respiratoria y, por consiguiente, con o sin liberación de virus en las

secreciones nasales (Slater, 1994). La infección respiratoria inicial, que posteriormente dará lugar al establecimiento de la latencia, podría haber ocurrido en cualquier momento del pasado, posiblemente meses o años antes del aborto o la enfermedad neurológica por EHV-1 (Allen, 2006). Esto proporciona un reto para el diagnóstico y control de las enfermedades producidas por EHV-1 y puede proporcionar una explicación para la circulación silenciosa de EHV-1 entre las yeguas preñadas, ya que se ha demostrado que durante la preñez se induce una inmunosupresión fisiológica en los equinos (Noronha y Antczak, 2012). La reactivación del virus puede (Gibson y col., 1992^a) o no (Edington y col., 1985) estar acompañada de enfermedad clínica. Cuando el virus está activo, hay lisis celular con liberación de la progenie viral que va a infectar a nuevas células. El EHV-1 puede traspasar hacia células endoteliales y epiteliales donde produce una infección lítica, con liberación de partículas infectivas. A su vez, durante la gestación también se producen cambios en el perfil de la respuesta del sistema inmunitario que pueden permitir que, en las yeguas infectadas, el virus se reactive y provoque abortos.

La reactivación del estado de latencia puede ocasionar abortos esporádicos, y posiblemente la enfermedad neurológica en un grupo cerrado de caballos, sin que haya una fuente externa de infección de EHV-1. Esto explicaría la ocurrencia individual de la mayoría de los casos de abortos (Crowhurst y col., 1981; Mumford, 1991; Dunowska, 2014) (**Figura 7**).

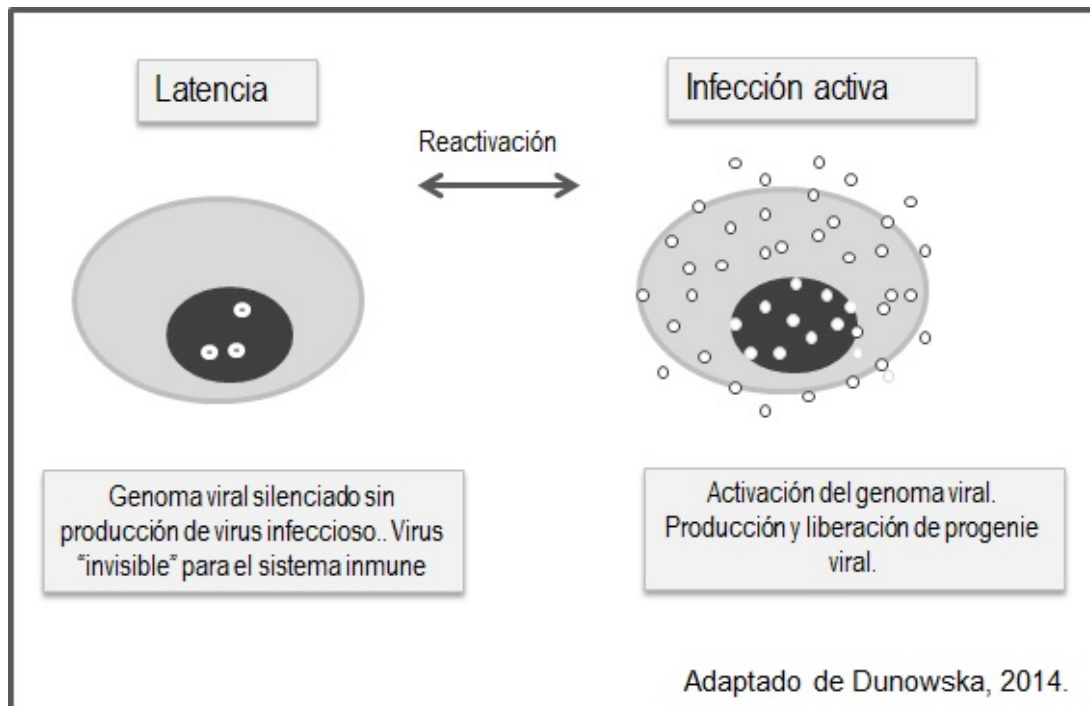


Figura 7. Esquema representativo del estado de latencia y reactivación del alfa herpesvirus equino 1. (Adaptado a partir de Dunowska, 2014)

PATOGÉNESIS VIRAL

La infección inicial ocurre en las células epiteliales de la mucosa del tracto respiratorio superior, tras la inhalación de partículas virales, por contacto directo con placentas o fetos provenientes de abortos que contienen altas cantidades de partículas virales, o a través de fomites contaminados. También puede infectarse el epitelio conjuntival luego del contacto con aerosoles. El mecanismo y los demás factores involucrados en el ingreso a la célula permanecen aun sin conocerse completamente; sin embargo, se han considerado a proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad 1 (CMH-1) e integrinas, como receptores para EHV-1. A las 12 h pi puede detectarse

el virus, mediante las técnicas de aislamiento viral (AV) e inmunohistoquímica/fluorescencia (IHQ/IF), en las células epiteliales infectadas de la nasofaringe, tráquea y bronquios ([Dunowska, 2014](#)).

Rápidamente, el virus atraviesa el epitelio respiratorio y se propaga por células dendríticas (CD), presentadoras de antígeno (Ag), de la lámina propia subyacente. Ya en las primeras 24 h pi pueden detectarse leucocitos mononucleares infectados en los linfonódulos asociados a las vías respiratorias. Dentro de este tejido se produce una nueva multiplicación viral y el drenaje de leucocitos infectados a la circulación, iniciándose de esta manera la viremia asociada a leucocitos ([van der Meulen y col., 2006](#)). Por lo tanto, el virus llega a los sitios de replicación terciaria, tales como el endotelio de los vasos sanguíneos del útero y del sistema nervioso central (SNC).

La infección de células epiteliales y leucocitos en los pulmones se puede observar desde el día 3 hasta el día 13 pi ([Kydd y col., 1994](#)), con un pico en el día 9 pi, cuando pueden formarse, ocasionalmente, trombos no oclusivos en el intersticio pulmonar. El virus generalmente es eliminado del tracto respiratorio dentro de las tres semanas de la infección primaria y, entre una y dos semanas después de la misma, cuando se trata de reinfecciones ([Gibson y col., 1992](#)). En el estadio inicial de la infección nasal y conjuntival, el virus accede a través de las terminaciones nerviosas y llega a las neuronas del ganglio trigémino a las 48 h pi aproximadamente ([Slater y col., 1994](#)). El daño local de la mucosa respiratoria predispone a infecciones respiratorias secundarias por otros agentes infecciosos.

El EHV-1 se puede aislar de exudados de tracto respiratorio durante 10-12 días luego de iniciados los signos clínicos dependiendo del estado inmune del hospedador o de las propiedades del virus ([Gibson y col., 1992b](#)), aunque en equinos con enfermedad subclínica el virus es recuperado durante un período de tiempo menos prolongado. Sin embargo, a partir del día 4 ó 5 pi también puede ser aislado de leucocitos circulantes. Por último, el virus se elimina a través de los exudados nasales, saliva y, posiblemente, por las heces durante el período de infección aguda; además es abundante en los fetos abortados, y en líquidos y membranas fetales ([Allen y Bryans, 1986](#)). La **figura 8** resume la patogenia de la infección por EHV-1.

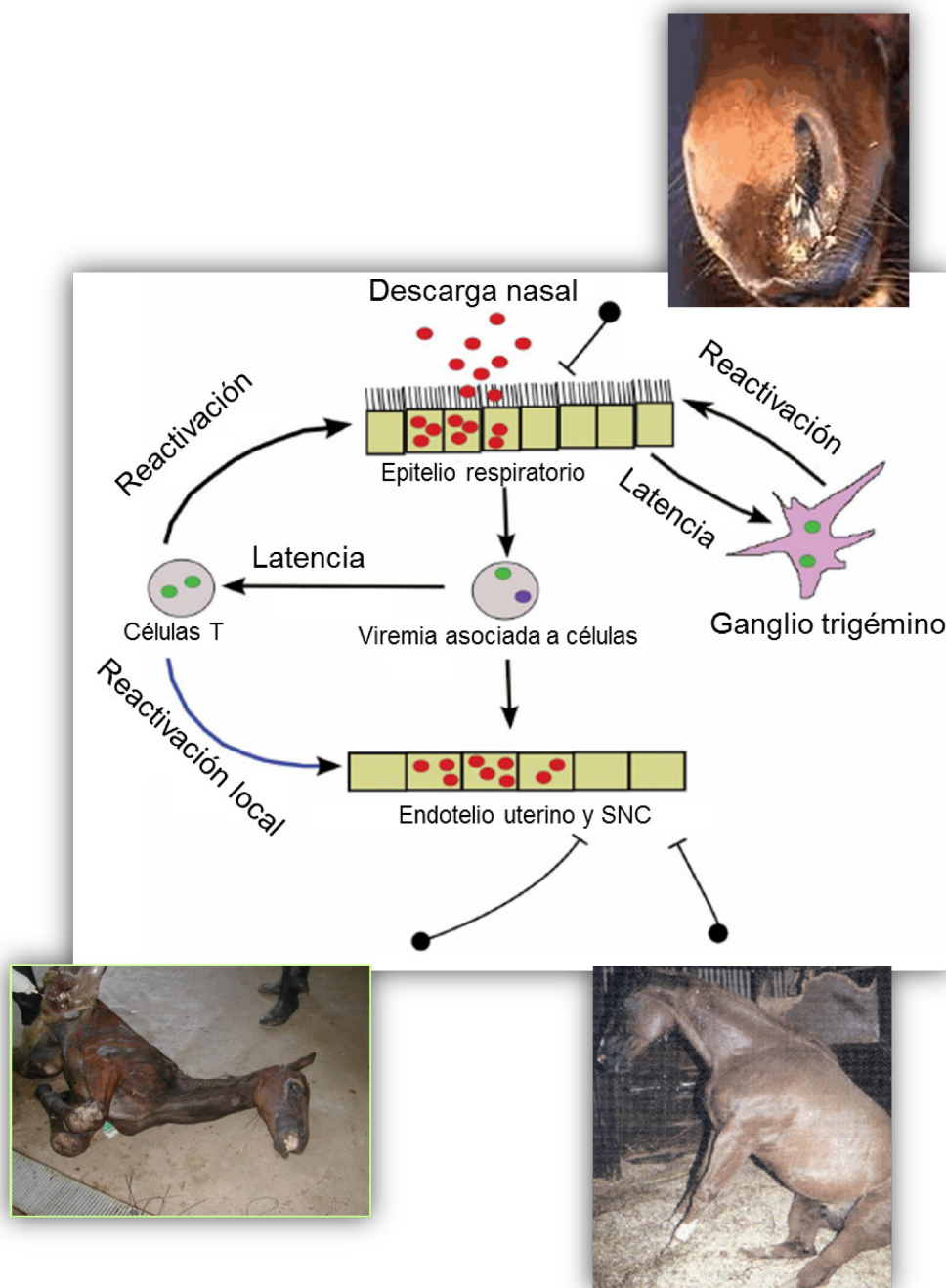


Figura 8. Esquema que ilustra la ruta patogénica del *alfaherpesvirus equino 1* desde el epitelio respiratorio para luego establecer la latencia en el ganglio trigémino o en linfocitos, y su posterior llegada, tras la reactivación, al útero preñado o al sistema nervioso central (SNC) (Modificado a partir de Dunowska, 2015 con el uso de imágenes de Allen y col., 2004)

Las dos secuelas clínicas más importantes de la infección respiratoria por EHV-1 son el aborto y el síndrome neurológico y, para que éstos ocurran, debe producirse una viremia asociada a los leucocitos que permita la diseminación del virus a sitios distantes del tracto respiratorio, incluyendo el tracto reproductivo y el SNC. Por lo tanto, el establecimiento de la viremia es un requisito previo para el aborto. Sin embargo, el aborto no necesariamente sigue a la viremia, incluso en yeguas en el último tercio de la gestación. Esta viremia involucra principalmente a linfocitos T CD5+/CD8+ y raramente se detectan virus libres en sangre. Una vez en el torrente sanguíneo, los leucocitos infectados se adhieren a las células endoteliales, mediante receptores todavía no identificados, en un proceso que puede ser facilitado por alteraciones en la expresión de moléculas de adhesión, citoquinas y hormonas en el microambiente. En inoculaciones experimentales, la viremia comienza al día 3 pi y puede persistir hasta 22 días pi. El intervalo entre la aparición de la viremia y el aborto puede variar de 6 a 81 días, aunque como mencionamos previamente no siempre el aborto sigue necesariamente a la viremia ([Smith y col., 1998](#)). En el caso de cepas de alta virulencia, la infección de las células endoteliales del útero preñado causa vasculitis que afecta particularmente a las arteriolas del endometrio en la base de los microcotiledones. Cuando estas lesiones son extensas, se observa vasculitis multifocal y microtrombosis que producen isquemia generalizada. En este caso el aborto puede suceder antes de que el virus llegue al feto, siendo en estos casos la detección negativa en sus

tejidos. En el caso de cepas menos virulentas o menos endoteliotrópicas, las lesiones son menores y el virus alcanza a atravesar la placenta produciendo el aborto de un feto infectado que se detecta como positivo por las técnicas virológicas convencionales. También se ha observado que con cepas menos virulentas no se reconocen Ag virales en útero y placenta, postulándose que el virus podría cruzar la placenta y llegar al feto dentro de los glóbulos blancos en donde desarrolla su estado de latencia ([Edington y col., 1991](#); [Smith y col., 1992](#); [Smith y col., 1993](#); [Smith y col., 1996](#)). La susceptibilidad de las células endoteliales uterinas a la infección por EHV-1 es menor en la preñez temprana que en la tardía ([Allen y col., 2004](#)) (**Figura 9**).

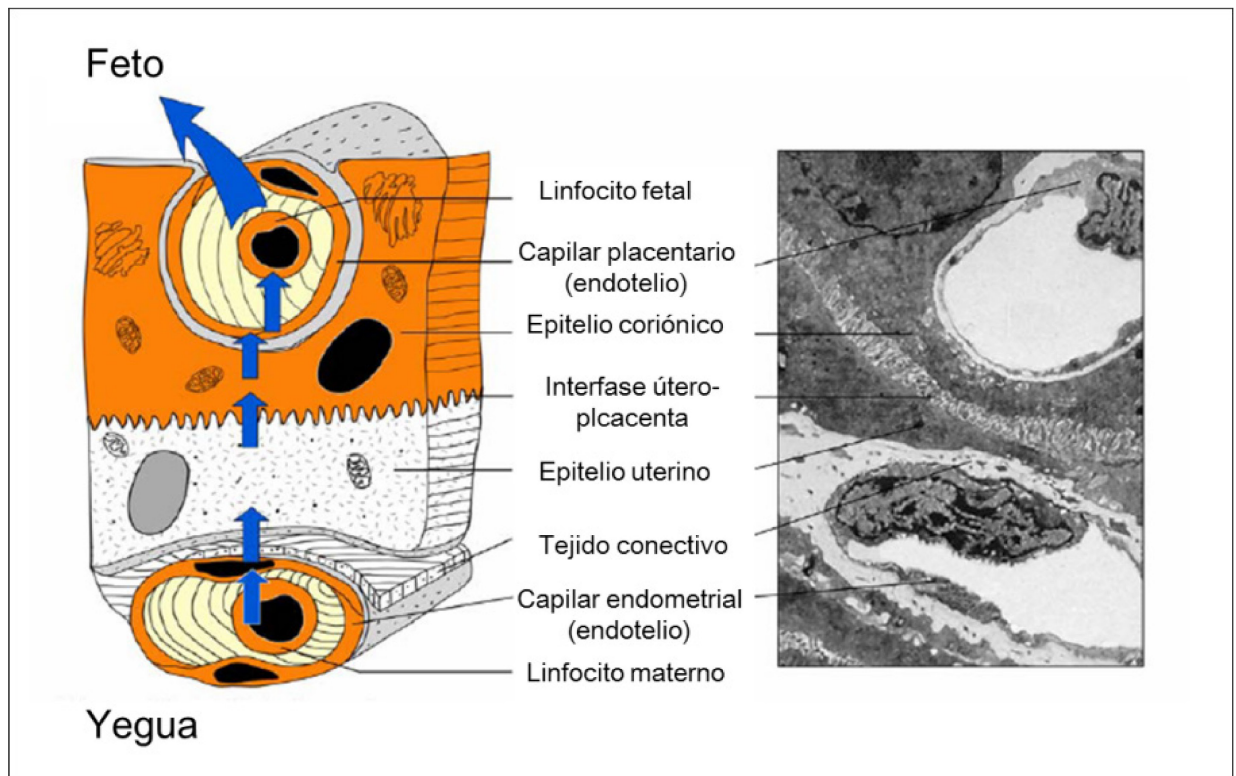


Figura 9. Modelo esquemático de la ruta propuesta de diseminación de la infección a través de la barrera útero-placentaria, desde un linfocito infectado en un capilar del endometrio de la yegua hasta un linfocito en la circulación fetal, indicado por las flechas. (Modificado de Allen y col., 2004).

Se ha demostrado, por medio de aislamientos virales en células endoteliales, que el virus es capaz de replicarse en potros inmunológicamente inmaduros, pero no así en adultos inmunocompetentes. Esta observación sugiere que la madurez o inmunidad del huésped, además de los factores virales, pueden desempeñar un papel en la diseminación de la infección por EHV-1 en las células endoteliales (Allen y col., 2004).

Se piensa que los procesos inmunes e inflamatorios tienen un rol importante en la mediación de la patología vascular inducida por el EHV-1,

pero la importancia de estos procesos aún no se ha dilucidado completamente. El virus sólo se ha aislado ocasionalmente del SNC de caballos clínicamente afectados, pero pudo demostrarse la presencia de Ag virales por IHQ en células endoteliales de zonas con vasculitis ([Allen y col., 2004](#)). Generalmente los déficits neurológicos asociados con el síndrome neurológico causado por EHV-1 son el resultado de la infección de las células endoteliales y la resultante vasculitis y necrosis trombo-isquémica en cerebro y médula espinal. La falta de evidencia de replicación del virus en neuronas del ganglio trigémino equinos contrasta con la patogenia bien establecida de la encefalitis infecciosa causada por herpesvirus neurotrópicos en otras especies animales. Se ha sugerido que los eventos inmunopatológicos que acompañan la infección por EHV-1 de las células endoteliales vasculares pueden desempeñar un papel en la patogenia de la enfermedad del SNC del EHV-1. Muchos autores sugieren que la respuesta inmunoinflamatoria producida dentro de la vasculatura del SNC puede desencadenar el proceso trombo-isquémico que sigue a la infección endotelial. Por lo tanto, la respuesta inmune del caballo puede contribuir, en sí misma, a la patogenia de la infección por EHV-1([Wilson, 1997](#); [Allen y col., 2004](#)).

SIGNOS CLÍNICOS - HISTOPATOLOGÍA

Enfermedad respiratoria

El período de incubación luego de una infección con EHV-1 en equinos es corto, generalmente de 1 a 3 días, aunque se han registrado períodos de incubación más largos, de hasta 10 días. Esta variación probablemente se deba a diferencias en la patogenicidad de la cepa del virus, la dosis de infección y el estado inmune del huésped. En los caballos previamente infectados, los signos respiratorios clínicos pueden ser leves y de corta duración. La infección respiratoria puede ser completamente asintomática en los caballos adultos, incluidas las yeguas preñadas, que hayan estado expuestas previamente al virus. Ésto es también lo que ocurre luego de la reactivación del estado de latencia durante el cual el virus infeccioso puede ser eliminado de la nasofaringe en ausencia de signos clínicos. En cambio, en caballos jóvenes, se desarrolla una enfermedad respiratoria de mayor duración. El animal comienza con un cuadro de enfermedad respiratoria (rinoneumonitis equina) caracterizado por rinofaringitis y traqueobronquitis, presentando depresión moderada, anorexia, fiebre (curva difásica con el segundo pico coincidente con la viremia), tos, congestión e hiperemia de la mucosa conjuntival, y secreción nasal serosa que puede progresar a mucosa y luego a mucopurulenta, esta última se atribuye generalmente a una infección bacteriana secundaria. Los signos clínicos permanecen por aproximadamente 7 días y las complicaciones bacterianas secundarias pueden conducir a la formación de abscesos en los ganglios y tejido linfoide

subepitelial de la faringe. Ocasionalmente se presenta bronconeumonía que puede llegar a ser fatal ([Allen y Bryans, 1986](#)) (**Figura 10**).



Figura 10. Rinoneumonitis equina. Se observa descarga nasal típica. (Imagen tomada de Allen y col., 2004).

En la recuperación de la enfermedad algunos caballos pueden desarrollar el denominado "síndrome de bajo rendimiento" que puede estar asociado con una hipersensibilidad bronquial no específica o con un síndrome parecido a la enfermedad pulmonar obstructiva crónica. Por lo tanto, las pérdidas económicas asociadas con este virus, no solo dependen de los costos de la atención veterinaria, sino también de los efectos perjudiciales a largo plazo relacionados al rendimiento deportivo del animal ([Mumford y Rosedale, 1980](#)).

Las lesiones macroscópicas más relevantes consisten en hiperemia, necrosis y ulceración del epitelio de las vías respiratorias y centros germinativos linfoides. Las lesiones microscópicas consisten en rinitis, bronquiolitis, alveolitis y edema intersticial. Se observa infiltración de neutrófilos en los bronquiólos, infiltración mononuclear en la región perivascular, fluido serofibrinoso en los alvéolos y cuerpos de inclusión intranucleares ([Allen y col., 2004](#)).

Aborto

Las hembras infectadas con EHV-1 abortan de manera súbita, sin signos premonitorios y generalmente sin evidencia de infección respiratoria previa. La placenta suele ser expulsada junto con el feto que permanece con las membranas fetales intactas. En el momento del aborto, el feto por lo general muere por asfixia debido a la separación repentina de la placenta del endometrio que precede a la expulsión fetal. Algunos fetos pueden nacer vivos pero mueren rápidamente por una insuficiencia respiratoria resultante de las lesiones pulmonares inducidas por la infección. En la mayoría de los casos se producen abortos aislados y en general las hembras abortan una sola vez. En algunos establecimientos pueden observarse “tormentas de aborto” que resultan en brotes de abortos múltiples, llegando a afectar hasta el 75% de las hembras gestantes.

La mayoría de los abortos por EHV-1 ocurren durante los últimos cuatro meses de gestación, entre los 15 y 120 días posteriores a la infección

viral. Una vez que una yegua ha abortado, su futuro reproductivo no suele ser afectado, pudiendo concebir con éxito poco después del aborto. Las yeguas parecen ser refractarias al aborto después de la infección experimental.

Las lesiones encontradas en los fetos difieren según su edad. Si el aborto ocurre con posterioridad al 7mo mes, los fetos presentan diferentes grados de ictericia, petequias en las mucosas, edema pulmonar, hidrotórax, esplenomegalia, moderada hepatomegalia y cascos amarillos debido a la tinción con el meconio. Microscópicamente las lesiones consisten en bronquiolitis, neumonitis y necrosis de la pulpa blanca esplénica, del hígado y las glándulas adrenales. En todos los casos se observan cuerpos de inclusión en el hígado, los pulmones, el timo y la pulpa roja esplénica. En algunos casos puede observarse enteritis necrotizante. La placenta en general está libre de lesiones y de cuerpos de inclusión. Los fetos abortados antes del séptimo mes, que no son muy frecuentes, presentan severa autólisis y en ellos no pueden observarse las lesiones típicas, por lo tanto, raramente se observan inclusiones intranucleares y reacción inflamatoria (Smith y col., 1992; Smith y col., 1996; Allen y col., 2004) (**Figura 11**).

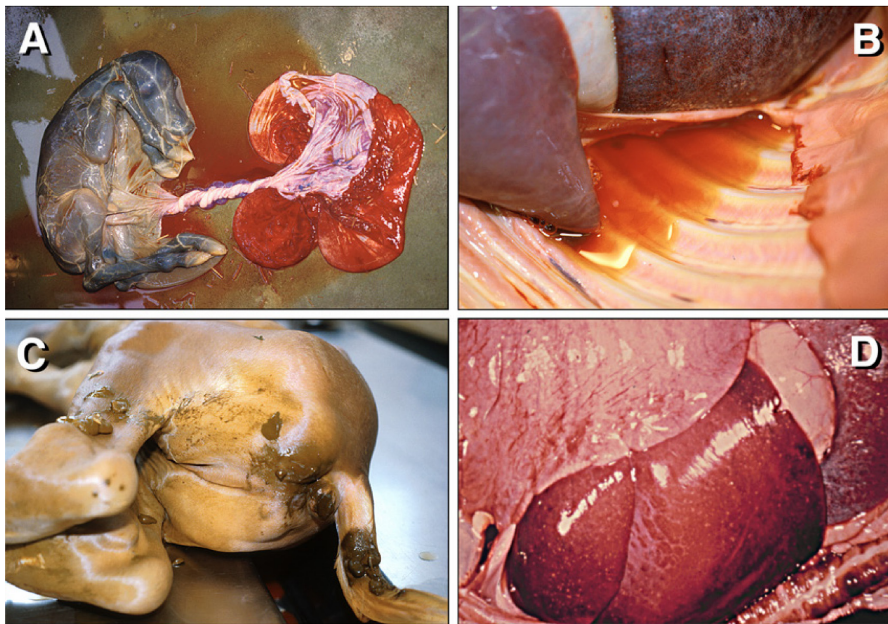


Figura 11. Aborto causado por el *alfaherpesvirus 1*. **(A)** Se observa el feto con sus membranas fetales intactas y la placenta, **(B)** disección de feto abortado que muestra edema pulmonar y derrame pleural, **(C)** meconio en la región perineal del feto abortado, **(D)** focos subcapsulares de necrosis en la superficie hepática de un feto abortado (Imagen tomada de Allen y col., 2004)

Síndrome neonatal

Cuando la infección por EHV-1 ocurre en el último tercio de la gestación los potrillos pueden nacer vivos. Algunos presentan un severo estado de depresión al nacer y mueren dentro de las primeras 24 h de vida; otros nacen aparentemente normales e inmediatamente después presentan un severo cuadro respiratorio y diarrea que les produce la muerte luego de las primeras 72 h del nacimiento. Las lesiones observadas en este último tipo de manifestación clínica consisten en la presencia de pulmones voluminosos y firmes con edema y congestión, y además pueden observarse lesiones en las glándulas adrenales. Al examen microscópico los pulmones presentan

alveolitis no supurativa, bronquitis y bronquiolitis necrotizante. Los cuerpos de inclusión intranucleares de herpesvirus son comunes en las áreas afectadas. Pueden observarse necrosis hepática y también hiperplasia de células caliciformes en la mucosa yeyunal. En la enfermedad primaria por EHV-1 de neonatos muy jóvenes, en los que la muerte es rápida (de uno a tres días pi), los hallazgos patológicos se evidencian como las lesiones virales agudas descritas en el tracto respiratorio.

Si el potrillo sobrevive por más de 5-14 días pos nacimiento, se pueden producir complicaciones bacterianas secundarias que llevan a bronconeumonía purulenta, enteritis necrotizante, septicemia y destrucción necrótica masiva de la población de linfocitos tímicos y esplénicos, un cuadro que le hace alejarse de la yegua y, como consecuencia, deja de alimentarse y muere a los días ([Murray y col., 1998](#)).

Síndrome neurológico

Los signos nerviosos pueden aparecer entre los 6 a 10 días posteriores a la infección respiratoria en animales de cualquier sexo y edad. Sin embargo, también pueden iniciarse como resultado de la reactivación del virus latente (endógeno). Los signos dependen de la extensión y localización de las lesiones, principalmente se produce mieloencefalopatía de aparición repentina, usualmente sin enfermedad respiratoria. Los signos clínicos nerviosos tienen un pico de intensidad a los 2-3 días de su inicio y varían desde ataxia moderada, hasta parálisis completa de miembros torácicos y

pelvianos con incontinencia urinaria. El pronóstico para los caballos que no quedan en decúbito es favorable, pero aquellos que permanecen en esa posición por más de 2 días generalmente tienen complicaciones fatales, como neumonía, cólicos o rotura vesical. Las lesiones primarias consisten en vasculitis no supurativa, hemorragias focales y trombosis. Las hemorragias tienen una distribución al azar y afectan, en general, la sustancia blanca, principalmente en la médula espinal de la región lumbosacra. Los cambios necróticos son en general poco extensos, de localización variable y secundarios a las lesiones vasculares ([Whitwell y Blunden, 1992](#); [Dunowska, 2014](#)).

Infección ocular

La infección por el virus también puede causar enfermedad ocular, que se manifiesta como uveítis o coriorretinitis. La uveitis se describió en potrillos durante un brote de enfermedad neurológica en yeguas y sementales. La coriorretinitis en ausencia de uveítis, se puede observar a las 3-5 semanas después de la infección del tracto respiratorio y puede presentarse como tres tipos de lesiones: multifocales, focales o difusas. Las lesiones focales y multifocales no afectan en gran medida la visión, pero las lesiones difusas pueden resultar en la destrucción extensa de la retina, causando ceguera ([Slater y col., 1992](#); [McCartan y col., 1995](#)).

Trastornos en sementales

La infección también puede traer consecuencias reproductivas para los sementales, tales como edema escrotal y pérdida de libido. Debido a la pirexia prolongada puede alterarse la espermatogénesis y se reduce el número de espermatozoides morfológicamente normales. Algunos investigadores encontraron partículas virales en semen, pero su importancia para la transmisión venérea de la infección aun es incierta ([McCartan y col., 1995](#); [Tearle y col., 1996](#)).

Infección vasculotrópica pulmonar

Se observa ocasionalmente en caballos jóvenes. El inicio de la enfermedad es repentino y su curso de progresión rápida hasta la muerte, por lo que los animales afectados pueden ser encontrados muertos. Se caracteriza por fiebre alta, anorexia, depresión, dificultad respiratoria y alta mortalidad. No se acompaña de signos nerviosos. En la necropsia el hallazgo que predomina es una vasculitis multisistémica particularmente importante en los pequeños vasos sanguíneos de los pulmones ([Del Piero y Wilkins, 2001](#)).

EPIZOOTIOLOGÍA

El EHV-1 produce infección clínica y subclínica, y la mayoría de los caballos adultos poseen Ac contra este agente. La permanencia del virus en la naturaleza se debe a diferentes motivos, entre los cuales se citan: la infección generalizada de caballos jóvenes, la alta morbilidad (hasta el 90%)

y baja mortalidad, la alta prevalencia de animales con infección latente y la continua liberación de virus infeccioso de animales portadores. Por todo ello se produce la transmisión viral eficiente y sin interrupciones a las nuevas generaciones de equinos (**Figura 12**).

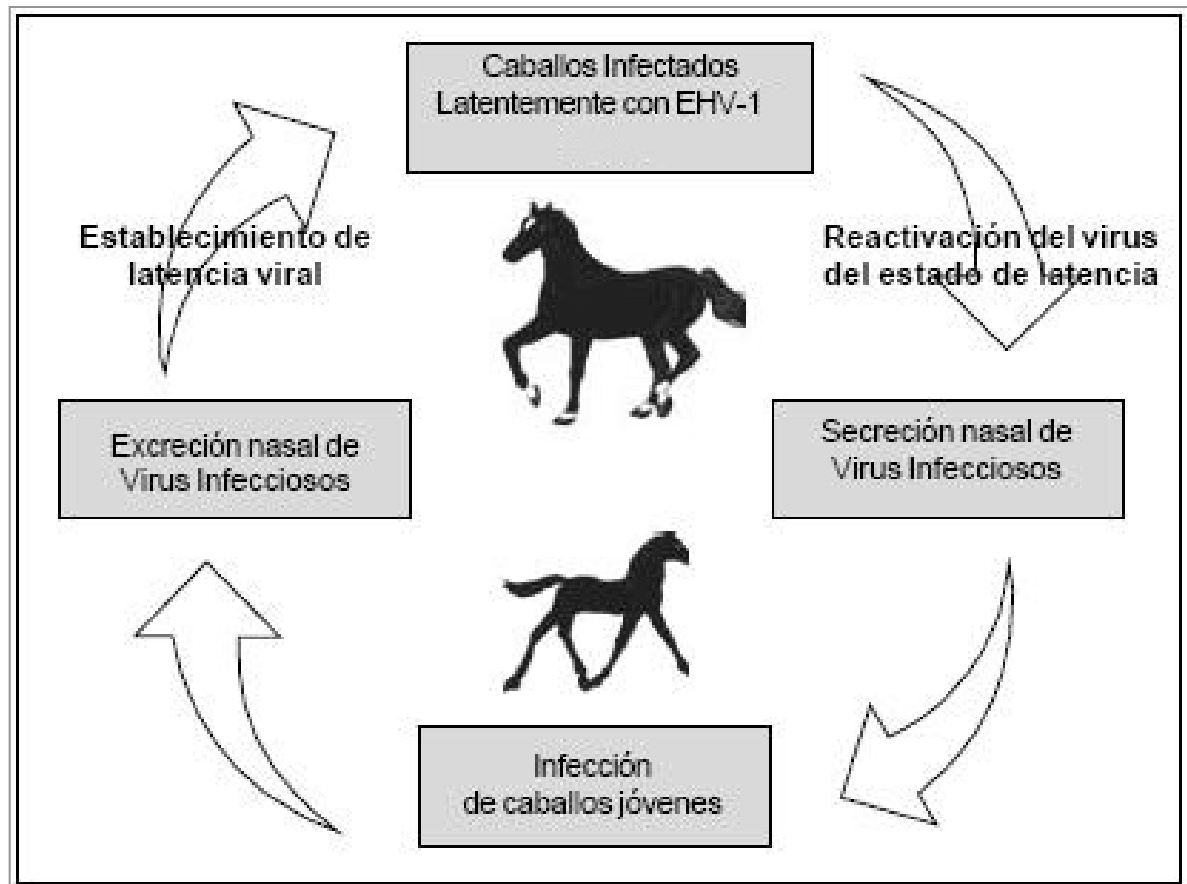


Figura 12. Ciclo de transmisión del alfa herpesvirus equino 1. (Adaptado a partir de Allen y col., 2004).

Durante el período inmediatamente posterior a la infección primaria por EHV-1 en los equinos, ocurren acontecimientos, no del todo conocidos,

que generan la infección latente de casi todos los animales recuperados, transformándose en portadores del virus a lo largo de toda la vida. Esta capacidad del EHV-1 para persistir en el caballo en un estado latente, pero potencialmente reactivo, después de la recuperación de la infección primaria, funciona como un depósito biológico del virus que sirve para continuar infectando nuevos hospedadores. La transmisión del virus a los animales susceptibles se produce por vía aerógena a través de caballos que eliminan el virus por infecciones respiratorias agudas o reactivadas, o por el contacto con fómites, fetos abortados y restos placentarios.

La forma respiratoria es común en potrillos al destete o cuando ingresan a los centros hípicos, mientras que la infección subclínica se presenta en animales de diferentes edades debido a reinfecciones sucesivas. Los potrillos se contagian principalmente luego de la reactivación de virus latente en la yegua, con posterior propagación a otros potrillos susceptibles. En general, existe un patrón epidemiológico cíclico y, en la mayoría de los casos, silencioso de infecciones endémicas de EHV-1, en el que las yeguas sirven como reservorio de virus infeccioso y lo transmiten a cada nueva cría durante los períodos de pre-destete y destete.

La liberación de virus a través de las secreciones respiratorias de animales infectados por primera vez puede llegar hasta 15 días pi, mientras que en los casos de reactivaciones es de 2-4 días pi. La mayoría de los equinos adultos presenta infecciones de tipo subclínico ([Gibson y col., 1992](#)).

Luego del primer ciclo replicativo en el tracto respiratorio se produce la fase virémica, donde el virus es transcripcionalmente activo, hay expresión de Ag virales en las células sanguíneas y es fácilmente recuperable por co-cultivo con células permisivas.

Después de la fase lítica inicial, el virus entra en estado de latencia en los linfocitos T CD8+ y en el ganglio trigémino. Como se ha descrito para otros alfa herpesvirus, la transcripción a partir del genoma de EHV-1 latente está restringida, las proteínas virales no se expresan, la célula infectada es resistente a la respuesta inmunológica del hospedador y el virus es difícil de recuperar por co-cultivos celulares (Welch y col., 1992; Slater y col., 1994; Baxi y col., 1995; Chesters y col., 1997) (**Figura 13**).

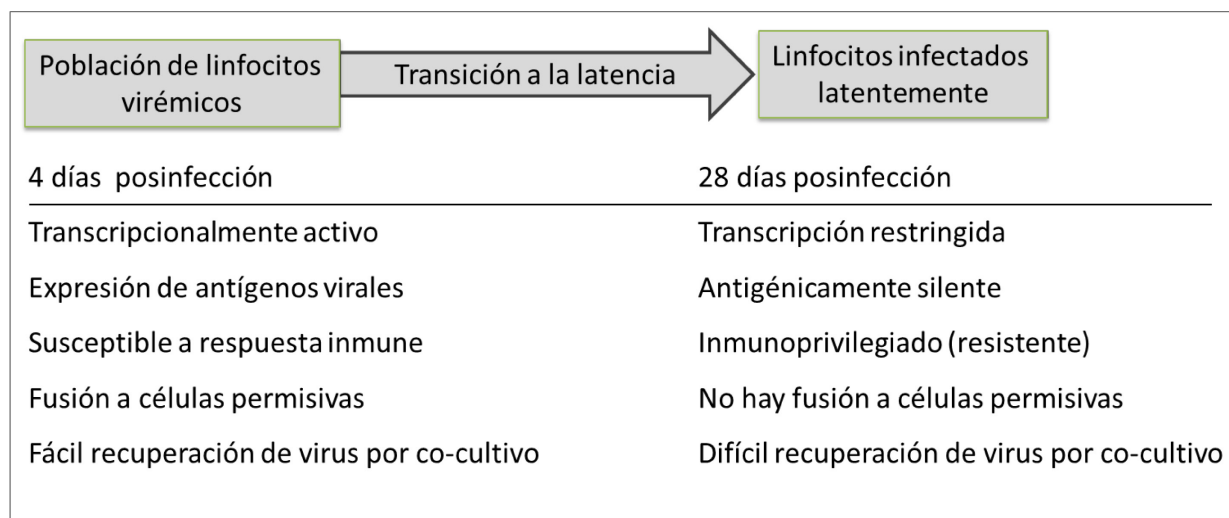


Figura 13. Cambios virales que caracterizan a los linfocitos virémicos y a los latentemente infectados (Imagen modificada de Allen y col., 2004).

Se estima que la cantidad de células infectadas en sangre periférica es de 1 cada 5000 leucocitos circulantes. Los caballos que presentan infecciones latentes de EHV-1 pueden experimentar episodios de reactivación viral que produzcan la liberación de partículas infecciosas en las secreciones del tracto respiratorio con el potencial de infectar a otros caballos susceptibles. La reactivación de virus en estado de latencia se produce cuando los animales se encuentran en situaciones de estrés, como por ejemplo durante el transporte, ante cambios en ciertas medidas de manejo, durante el destete, movimientos de potreros, como así también por tratamientos con corticoides o prácticas deportivas exigentes.

Es importante destacar que la enfermedad clínica en algunos casos puede no manifestarse después de una reactivación y, por lo tanto, ser silente. Este escenario genera dificultades de manejo, ya que nuevos casos de infección por EHV pueden desarrollarse en grupos cerrados y aislados de caballos que han tenido contacto con animales infectados que no manifiesten la enfermedad.

La capacidad de los linfocitos infectados de adherirse y fusionarse con células endoteliales vasculares permisivas del caballo permite el retorno del virus reactivado al epitelio respiratorio. La viremia asociada a las células que sigue a la reactivación puede dar lugar a la diseminación de viriones infecciosos al útero causando aborto o, potencialmente, al SNC para producir síndrome neurológico.

El aborto también puede suceder por la llegada al útero de linfocitos que se encuentran en el endometrio de hembras preñadas, transfiriendo de esta manera el virus infeccioso al endotelio e iniciando así la cascada de eventos que conducen al aborto. Es decir, el aborto puede ocurrir sin el requisito previo de una infección respiratoria epitelial lítica o de una viremia detectable. El EHV-1 es el primer alfa herpesvirus para el que se ha descrito reactivación en los linfocitos, además de la reactivación en el ganglio trigémino. La latencia y la reactivación juegan un papel particularmente importante en la epidemiología del aborto por EHV-1, ya que la mayoría de los abortos afecta a yeguas individuales dentro de un grupo, lo que implica que el aborto ha resultado de la reactivación del virus latente, en lugar de ocurrir luego de una infección respiratoria reciente. La forma nerviosa puede presentarse concomitantemente con abortos y es precedida generalmente por signos clínicos respiratorios ([Mumford y col., 1985](#), [Allen y col., 2004](#)).

RESPUESTA INMUNE

La respuesta inmune de los equinos a una infección por EHV-1 es similar a la que sucede en otras especies infectadas por herpesvirus. El mecanismo incluye a la respuesta innata y adaptativa, tanto celular como humoral ([Allen y Bryans, 1986](#); [Allen y col., 2004](#)). Los Ac maternos transmitidos por el calostro protegen a los potrillos de la infección natural, pero la inmunidad conferida depende de su concentración en el calostro y del volumen ingerido por el potrillo en las primeras 24 h de vida. Los Ac

calostrales poseen una vida media de 26 días y decaen exponencialmente, de manera que aproximadamente entre los 4-6 meses de edad los potrillos se pueden infectar naturalmente. La infección natural del tracto respiratorio de los equinos es seguida por la rápida aparición de Ac en sangre, pero el título decae exponencialmente, por lo que los animales se tornan nuevamente susceptibles al virus y a la re-infección entre los 4 y 5 meses posteriores a su recuperación.

La resistencia a la reinfección durante este período se encuentra garantizada por: 1) los elevados niveles de Ac en sangre y en el mucus nasofaríngeo, 2) la actividad proliferativa de linfocitos T CD4+ activados por el virus, 3) la presencia de precursores de linfocitos T citotóxicos CD8+ virus específicos, 4) la actividad de células *natural killer* (NK), y 5) la citotoxicidad celular dependiente de Ac virus específica (Allen y col., 2004). Cuando estos mecanismos de resistencia disminuyen, la mucosa respiratoria puede ser reinfectada por el virus en forma repetida.

En las reinfecciones múltiples no se presentan signos clínicos de enfermedad respiratoria, pero pueden presentarse manifestaciones de enfermedad neurológica o abortiva. Si bien se sabe que la inmunidad mediada por células puede modificar la frecuencia de la enfermedad, y ayudar a la recuperación de los animales y a la inhibición de la replicación viral *in vitro*, aun no se ha podido dilucidar exactamente el rol que desempeña en la infección natural. El mecanismo por el cual el virus escapa a la neutralización por Ac en su pasaje al feto está estrechamente

relacionado con la viremia asociada a células, de manera que el virus llega al útero preñado sin ser neutralizado ellos. La leucopenia que se observa durante la fase virémica es más intensa en hembras preñadas, y el hecho que las yeguas que abortan, debido a la infección por el virus, raramente abortan de nuevo al año siguiente sugiere alguna alteración cualitativa de la inmunidad mediada por células, indicando que la protección contra EHV-1 es compleja ([Mumford y col., 1994](#); [Dunowska, 2014](#)).

Los herpesvirus, incluido el EHV-1, han desarrollado durante su evolución diversos mecanismos para evitar ser eliminados por la respuesta inmune del huésped ([Van Der Meulen, 2006](#); [Ma y col., 2013](#)). Entre ellos se destaca la capacidad para disminuir la expresión de las principales proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad 1 (CMH-1) en las células infectadas ([Ma y col., 2012](#)), evitar la lisis mediada por células *NK* y permanecer quiescente dentro de neuronas y linfocitos mediante el desarrollo de latencia ([Huang y col., 2014](#)). Otros mecanismos de evasión incluyen la supresión de la activación de linfocitos a través de interacciones de citoquinas del hospedador ([Coombs y col., 2006](#)).

DIAGNÓSTICO

La identificación rápida del agente etiológico causante de la rinoneumonitis y del aborto equino dentro de un grupo de caballos es esencial para tomar las decisiones para decidir el tratamiento más correcto y poder planear las estrategias para controlar la diseminación epizoótica de la

infección y evitar los posibles abortos subsecuentes. Es importante realizar el diagnóstico diferencial con otros agentes, como el virus de la influenza equina, el adenovirus, el rinovirus y el virus de la arteritis equina. Dado que los signos clínicos solos no son suficientes para diferenciar a los herpesvirus de otras causas comunes de enfermedad del tracto respiratorio, es necesario realizar pruebas de laboratorio para arribar a un diagnóstico certero ([Allen y col., 2004](#); [Dunowska, 2014](#)). La confirmación del agente etiológico está basada en determinar la presencia de virus activo en secreciones nasofaríngeas, en los leucocitos de sangre periférica de los caballos afectados o en órganos de fetos abortados.

El éxito del diagnóstico de laboratorio se ve influenciado por los procedimientos utilizados para la recolección, el transporte, el almacenamiento y el procesamiento de las muestras clínicas. Los hisopados nasales deben realizarse dentro de las 48 h del comienzo de las primeras manifestaciones clínicas, cuando el animal todavía presenta fiebre y descarga nasal serosa. Las muestras de secreciones respiratorias se obtienen con un hisopo de algodón que se inserta a través del meato nasal ventral, avanzando por la nasofaringe. Los hisopos deben ponerse en un medio de transporte fluido que contenga antibióticos y se mantenga refrigerado, para conservar la viabilidad del virus para la posterior inoculación y cultivo de tejidos. Por otro lado, el período óptimo para lograr la detección del virus a partir de sangre es entre 4 y 10 días del comienzo de la enfermedad respiratoria. En caso de tratarse de fetos abortados, las

muestras deben tomarse y transportarse en forma estéril, inmediatamente de sucedido el aborto. El transporte rápido al laboratorio y el procesamiento inmediato también son importantes para el éxito del diagnóstico de laboratorio de las infecciones producidas por EHV-1.

Las técnicas disponibles para el diagnóstico de laboratorio incluyen el aislamiento viral -AV- (técnica de referencia), la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la detección de Ag virales por inmunofluorescencia directa o por inmunoperoxidasa, y las pruebas serológicas. La prueba que brinda los mejores resultados es el AV a partir de secreciones nasofaríngeas o de los leucocitos sanguíneos, después de su inoculación en monocapas de cultivos celulares susceptibles. Los tipos de efectos citopáticos de EHV-1 son característicos (aumento de la refringencia celular, lisis, cuerpos de inclusión, formación de sincicios). El diagnóstico por AV es confirmatorio, pero presenta la desventaja de insumir mucho tiempo para obtener un resultado. La amplificación de ADN viral mediante PCR es un ensayo rápido, sensible y utilizado con gran frecuencia a partir de muestras clínicas ([Rimstad y Evensen, 1993](#); [Rimstad y Hyllseth, 1994](#)). Para el mismo no es indispensable contar con virus viable, debido a que la técnica determina presencia de genoma viral.

El diagnóstico *ante-mortem* de la enfermedad neurológica es difícil debido a que los signos clínicos se asemejan a aquellos producidos por otros virus. Asimismo, el comienzo de las manifestaciones clínicas, entre 4 y 9 días pi dificulta la detección del virus.

La detección de Ac en suero puede realizarse mediante técnicas de ELISA, pruebas de neutralización viral (VN) o de fijación de complemento. Debido a que no hay técnicas estandarizadas internacionalmente para realizar dichas pruebas serológicas, las determinaciones del título de Ac en un mismo suero pueden ser diferentes de un laboratorio a otro. La prueba de ELISA y la de fijación de complemento tienen la ventaja, por sobre la VN, de dar resultados más rápidos y de no requerir el uso de cultivos celulares. Todas las pruebas serológicas mencionadas detectan la presencia de Ac en sangre, pero éstos generan reacciones cruzadas entre el EHV-1 y el EHV-4, por lo que es difícil la diferenciación antigénica mediante el uso de sueros policlonales. Solamente existe un ensayo ELISA específico de tipo, que puede distinguir entre Ac contra el EHV-1 y el EHV-4 ([Hartley y col., 2005](#)) y que está disponible comercialmente (Boehringer Ingelheim Svanova). La prueba de VN es un ensayo serológico sensible que se utiliza ampliamente para detectar Ac contra EHV-1/EHV-4. Para el diagnóstico serológico se requieren muestras de suero pareadas, la primera muestra (fase aguda) debe obtenerse dentro de los 2-3 días de la aparición de los signos clínicos, y la segunda muestra (muestra convaleciente) debe tomarse; aproximadamente, entre 2 y 4 semanas después. Un incremento en cuatro diluciones o más en el título de Ac específicos contra EHV-1 o EHV-4 entre las muestras de suero del estado agudo y convaleciente es una confirmación serológica de infección reciente con alguno de estos virus. Debido a que el Ac inducido por la vacunación puede confundir la interpretación de resultados

serológicos, la historia clínica respecto a la vacunación del animal debe tenerse en cuenta para asegurar que la seroconversión refleje la infección en lugar de una reciente vacunación. La detección de Ac contra EHV-1 en sangre procedente de corazón, cordón umbilical o de otros líquidos fetales puede tener valor diagnóstico en casos de fetos abortados que son negativos a las técnicas de reconocimiento viral ([Smith y col., 1996](#)).

PREVENCIÓN Y CONTROL

La capacidad de EHV-1 para infectar a potros jóvenes en presencia de Ac maternos ([Gilkerson y col., 1999](#)), combinada con el desarrollo de la latencia después de la infección primaria ([Allen, 2006](#)), hace que sea poco probable eliminar completamente el EHV-1 de cualquier establecimiento equino ([Dunowska., 2014](#)).

Los objetivos de vacunar contra EHV-1 son principalmente: reducir la incidencia o gravedad clínica de la enfermedad en caballos expuestos al virus, y contener la propagación de la infección viral durante brotes individuales, para lograr proteger a los equinos de la enfermedad respiratoria y del aborto, y a su vez, evitar de esta manera grandes pérdidas económicas en la industria hípica. La base para lograr estos objetivos es la combinación de un programa continuo de inmunización profiláctica y la implementación de un conjunto de prácticas de control establecidas.

Las estrategias de manejo que minimizan el estrés pueden afectar la frecuencia de la reactivación viral y limitar así las fuentes de contagio en los

establecimientos. Algunos de los controles de rutina consisten en monitorear la temperatura corporal en un brote e identificar caballos febriles, ya que deben considerarse infecciosos y, por ello, mantenerse bajo condiciones que minimicen la propagación del virus a otros animales. Las medidas exactas aplicadas dependerán del tipo de establecimiento afectado, pero deben incluir, como ya mencionamos, la separación física de los casos identificados y el uso de guantes y ropa de protección adecuados, así como el lavado frecuente de manos, y la limpieza y desinfección de cualquier equipo compartido entre diferentes animales ([Goehring y col., 2010a](#); [Kydd y col., 2012](#)).

Existen vacunas (ya sea para EHV-1 solo o en combinación con EHV-4) con virus inactivado, generalmente con formaldehído, y asociadas a diferentes tipos de adyuvantes de uso común para ser administradas vía parenteral. Este tipo de vacunas, si bien son seguras porque carecen de virus activo, presentan el inconveniente de inducir una respuesta inmune de corta duración, lo que exige la repetición de dosis. Si el propósito de una vacuna es prevenir la enfermedad, reducir la incidencia, la duración de los signos clínicos y el periodo de eliminación viral, las vacunas inactivadas cumplen con estos objetivos. Sin embargo, si tenemos en cuenta que el EHV-1 produce viremia asociada a células, se puede inferir que estas vacunas no son totalmente efectivas y algunas partículas virales pueden llegar al feto y producir el aborto. Existen además vacunas atenuadas que son utilizadas en algunos países sobre todo en poblaciones equinas

confinadas en un solo establecimiento (Kydd y col., 1994; Heldens y col., 2001; Allen y col., 2004; Patel y Hendels, 2005; Goehring y col., 2010).

Estudios recientes han demostrado que la inmunización intranasal con la gpD en ratones BALB/c, induce una respuesta inmune humoral local con secreción de inmunoglobulinas A que protege a los animales de la posterior infección experimental. Estos resultados indican que este tipo de vacunas podría ser una alternativa viable a ser utilizada en potrillos antes del destete (Fuentealba y col., 2014).

En resumen, es poco probable que la vacunación por sí sola que proporcione una medida eficaz para la prevención y control de las enfermedades asociadas a EHV-1, por lo que debe complementarse con buenas prácticas de manejo y gestión (**Figura 14**).

CONTROL

- Dejar en cuarentena a los recién llegados durante al menos 21 días
- Personal capacitado que lleve a cabo las correspondientes medidas de higiene
- Mantener aislados a aquellos animales que presenten signos clínicos de enfermedad respiratoria
- Limpieza y desinfección rutinaria del establecimiento
- Desarrollar un programa de vacunación apropiado



MANEJO

- Mantener a los animales en grupos pequeños que correspondan a la misma edad
- Minimizar el stress
- Separar grupos con diferentes riesgos de enfermedad: como por ejemplo los potros destetados deben estar separados de las yeguas preñadas.

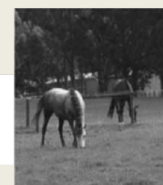


Figura 14. Control y prevención de la infección por alfaherpesvirus equino 1 (Tomado de Dunowska, 2014)

SITUACIÓN EN ARGENTINA

La existencia de rinoneumonitis en la República Argentina fue comunicada por primera vez por Monteverde y Garbers en 1949 ([De Diego, 1974](#)). Posteriormente, se detectaron Ac específicos contra el EHV-1 mediante estudios serológicos ([Matumoto, 1965](#)). En 1978 se demostró, mediante el uso de la técnica de inmunodifusión en gel de agar, la existencia de un 25% de equinos reactivos en la Pcia de Bs As. El Ag que se utilizó para la realización de este estudio se elaboró mediante la inoculación intraperitoneal a hámsteres de Siria lactantes de una cepa de referencia de EHV-1 adaptada a dicha especie ([Etcheverrigaray y col., 1978](#)). En el año 1980 se aisló el virus a partir de un feto equino abortado ([Etcheverrigaray y col., 1982](#)) y esta cepa, denominada SP1, fue utilizada posteriormente para la obtención de un Ag precipitante en cultivos celulares. En el año 1984 se describieron brotes epizooticos de enfermedad nerviosa asociada con este virus ([Nosetto y col., 1985](#)). En 1985 se realizó un nuevo AV a partir de leucocitos de un equino con cuadro clínico respiratorio ([Galosi y col., 1989](#)), y desde ese momento se han aislado varias cepas a partir de casos individuales de abortos, tormentas de abortos y enfermedad neonatal. El análisis de estas cepas, utilizando enzimas de restricción, demostró que el genoma EHV-1B está presente en Argentina desde el año 1996 ([Galosi y col., 1998](#); [Martinez y col., 2006](#)). Posteriormente, se realizó el primer análisis filogenético de aislamientos argentinos y se observó que presentan el mismo origen que cepas británicas y japonesas ([Martin Ocampos y col., 2009](#)). Por

otro lado, un estudio retrospectivo realizado en el año 2009 determinó que el 7% de las cepas aisladas en Argentina son mutantes neuropatogénicas (Vissani y col., 2009).

En relación al control de la infección por EHV-1 en Argentina, si bien la vacunación de animales no está oficialmente reglamentada, en algunos establecimientos se emplean planes de vacunación siguiendo los esquemas propuestos por otros países, que recomiendan el uso de vacunas inactivadas. Los programas de vacunación consisten en inmunizar hembras preñadas y potrillos jóvenes, para prevenir abortos y enfermedad respiratoria, respectivamente. Las crías que van a ser destetadas a los 6 meses de edad reciben dos dosis de vacuna con 3 a 4 semanas de intervalo entre ellas y un refuerzo a los 6 meses de la segunda dosis. Las hembras preñadas reciben tres dosis, 5°, 7° y 9° mes de gestación. En caso de tratarse de hembras preñadas que recién se las introduce en un establecimiento, se vacunan cada dos meses hasta el parto. El resto de los animales reciben una dosis ante cualquier circunstancia que pueda producirles estrés, o bien previamente a la llegada de nuevos animales. Las vacunas atenuadas no están permitidas oficialmente por el SENASA (www.senasa.gov.ar).

INMUNOLOGÍA DE LA GESTACION

El inicio y establecimiento de la gestación dependen de un evento natural como es la tolerancia inmunológica en la interfase materno-fetal por el cual el sistema inmunológico materno no inicia una respuesta contra el feto o embrión, que se consideran como semi-aloinjerto en la madre debido a que presentan genes tanto de origen materno como paterno. Estos últimos se definen como aloantígenos, por lo que deberían ser reconocidos como extraños por la madre y, en consecuencia, ser rechazados por su sistema inmunológico ([Barañao, 2010](#), [Vázquez-Rodríguez, 2011](#); [Arias y Villegas, 2010](#)). De todos modos, a pesar del contacto directo que ocurre entre las células trofoblásticas y el sistema inmunológico materno, durante la gestación normal, el embrión es tolerado y la preñez llega a término, sin un rechazo inmunológico, por lo que el feto representa una excepción a las reglas inmunológicas del rechazo, convirtiéndose la placenta en un sitio de inmunotolerancia activa hacia el embrión.

En el desarrollo de la tolerancia "materno-fetal" intervienen una serie de mecanismos que incluyen factores fetales, maternos y placentarios, que permiten que el útero gestante sea considerado un sitio inmunológicamente privilegiado y que, en conjunto, constituyen una red de reaseguro para evitar el rechazo embrionario, y por consiguiente, para permitir el desarrollo normal de la gestación. Estos mecanismos se han estudiado con detalle, en especial

en la placenta murina y humana, por lo que muchos de los datos provienen de los estudios realizados en estas especies.

Existe un estado en el que el útero se encuentra pre-acondicionado con un perfil determinado y específico de citoquinas, denominado “ventana de implantación” ([Chaouat y col., 2002](#)), que representa el período durante el cual el útero es receptivo para la implantación del blastocisto ([Duc-Goiran y col., 1999](#)).

Antes de que ocurra la implantación, suceden cambios hormonales que continúan durante toda la gestación. La progesterona disminuye la capacidad citotóxica del sistema reproductor femenino ([Piccini y Romagnani, 1996](#)), al regular de manera negativa la respuesta inmunológica de la madre para reaccionar hacia los Ag fetales y contra otros Ag con los cuales ha estado previamente en contacto ([Baraño, 2010](#)).

Las prostaglandinas presentes en el semen favorecen un estado de inmunosupresión en el tracto reproductor femenino logrando el establecimiento de una gestación sin dificultades ([Yranzo, 2004](#)). Además, se encuentra una baja respuesta hacia los Ag de histocompatibilidad paternos ([Davies, 2007](#)).

En la inmunología de la gestación se instala un acontecimiento de equilibrio inmunológico, que genera un ambiente hostil para el embrión o feto. Antes se pensaba que existía una fuerte inmunosupresión local durante la preñez, pero luego de varias investigaciones se postula que la placenta es

un sitio de tolerancia activa hacia el embrión, debido a la falta de respuesta inmunológica frente a un antígeno durante la gestación ([Barañao, 2010](#)).

Uno de los enigmas que más interrogantes presenta en la inmunología de la gestación es dilucidar por qué el embrión no es rechazado por el sistema inmune de la madre, ya que se comporta como un injerto semialogénico. Así es que por muchos años se ha investigado sobre los diferentes mecanismos que participan en la respuesta inmune, buscando una explicación para el inicio y establecimiento de una gestación exitosa, la cual se caracteriza porque la madre conserva su capacidad de respuesta inmunitaria al mismo tiempo que el feto es objeto de una protección especializada.

Rupert Billingham y Peter Medawar ([Medawar, 1953](#)), dos pioneros de la inmunología moderna, fueron los primeros en proponer el concepto del "aloinjerto embrionario" y sugirieron varias hipótesis para tratar de explicar el no rechazo materno-fetal, que se enumeran a continuación:

- 1) la separación anatómica de la madre y el feto por medio de la placenta que se comporta como una barrera y por lo tanto no permite el contacto directo entre las células inmunes maternas y los Ag fetales;
- 2) la inmadurez antigénica del feto;
- 3) el útero gestante es un sitio inmunoprivilegiado;
- 4) la existencia de un entorno favorable de inmunosupresión en el útero durante la preñez ([Raghupathy, 2001](#); [Hunt y col., 2005](#)).

Sin embargo, ninguna de estas hipótesis postuladas es totalmente válida. De todos modos, los estudios de Medawar (1953) han sido la base del conocimiento actual para muchas investigaciones sobre la inmunología de la gestación.

Evidencias experimentales indican que los aloantígenos fetales son reconocidos por el sistema inmune materno, pero este reconocimiento induce tolerancia en los linfocitos T y los linfocitos B específicos maternos y, por lo tanto, no existe una barrera totalmente impermeable, ya que se produce un tráfico bidireccional de células a través de la interfase materno-fetal, observándose células maternas en el feto y células trofoblásticas en el torrente sanguíneo materno ([Barañao, 2010](#)).

Uno de los mecanismos importantes en la inducción del estado de tolerancia en la madre hacia el feto, es el transporte de las células fetales hacia los linfonódulos maternos drenantes en donde presentan los aloantígenos fetales a las células T maternas, dejando en evidencia que el contacto entre las células inmunes maternas y las células de origen fetal no solo se produce en la interfase materno-fetal ([Yranzo, 2004](#)).

Por lo tanto, en el útero, desde la implantación y durante toda la gestación, los tejidos extraembrionarios y el sistema inmunitario se regulan mutuamente. Los primeros modulan la respuesta inmune generada para evitar la respuesta inflamatoria hacia los aloantígenos, mientras que el sistema inmunológico limita y a la vez permite la invasión de los tejidos trofoblásticos ([Moffett y Loke, 2006](#); [Mor y Cárdenas, 2010](#), [Huter y col.,](#)

2013). En esta regulación mutua se describen algunos mecanismos por medio de los cuales se genera la tolerancia inmunológica específica de la madre hacia el embrión. Dentro de los factores que intervienen, existen varias poblaciones celulares, entre ellas, los linfocitos T *helper* 1 (Th1), T *helper* 2 (Th2) y los T reguladores (Treg) y Th17, las CD, las células *Natural Killers uterinas* (uNK), los macrófagos, los mastocitos y las propias células trofoblásticas (Mor y Abrahams, 2003; Aplin y col., 2004; Bloys y col., 2004; Flaminio y col., 2005; Garfield y col., 2006; Bizargity y col., 2009; Saito y col., 2010; Schumacher y col., 2012). En el reclutamiento y comunicación de las poblaciones citadas están involucradas una gran cantidad de moléculas señalizadoras, tales como quemoquinas, citoquinas, hormonas, y factores de crecimiento. La identidad de estas moléculas está relativamente bien documentada para cada etapa de la preñez y también su importancia para la viabilidad del embrión o feto. Una correcta interacción determinará que la madre desarrolle tolerancia hacia el feto.

Balance Th1/Th2

Las citoquinas son un grupo grande y heterogéneo de proteínas de bajo peso molecular, capaces de mediar y regular la respuesta inmunitaria, que se encuentran en muy bajas concentraciones en condiciones fisiológicas. Son producidas y secretadas, no solo por los leucocitos, sino también por células endometriales, del trofoblasto, macrófagos y uNK. Las citoquinas podrán actuar como mediadores capaces de orientar el curso de

la respuesta inmunitaria, a través de la interacción con receptores celulares específicos. Esta interacción gatillará diferentes vías de señalización que darán lugar a un conjunto de respuestas biológicas que diferirá para las diferentes citoquinas y los distintos tipos celulares estimulados por ellas. Las citoquinas suelen agruparse en función de las actividades biológicas que median. Algunas ejercerán una acción inflamatoria, mientras que otras promoverán el desarrollo de procesos antiinflamatorios, a su vez promoverán la diferenciación de diferentes tipos celulares o regularán el tráfico leucocitario ([Barañao, 2010](#)).

Para el mantenimiento de la preñez, es necesaria una función adecuada de la red de citoquinas. Wegmann y col. ([1993](#)) postularon que, durante la gestación, el equilibrio fisiológico entre las citoquinas Th1/Th2 cambia hacia una actividad predominantemente Th2.

La activación de los linfocitos específicos se realiza a través de células presentadoras de Ag localizadas en todo el tracto reproductor. Entre las células presentadoras de Ag, se encuentran los macrófagos, las CD, las células interdigitantes y las de Langerhans. Su ubicación y distribución depende del órgano del tracto reproductor ([Parr y Parr, 1991](#)). Una vez que ingresan en el órgano linfático secundario, las células T interactúan con las células dendríticas quienes procesan y presentan Ag en forma de péptidos unidos al complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) clase I o II. Si reconocen estos péptidos, los linfocitos T vírgenes se activan, se expanden y se diferencian en linfocitos T efectores. Los linfocitos T CD4⁺ se activan al

reconocer péptidos antigénicos presentados por las moléculas de clase II del CMH; en cambio, los linfocitos T CD8⁺ se activan por el reconocimiento de péptidos presentados por las moléculas de clase I ([Vermeulen, 2011](#)). Existen dos tipos distintos de células T CD4⁺ efectoras, células Th1 y Th2, que difieren en su patrón de producción de citoquinas. Durante la gestación colaboran en la inducción de la tolerancia materno-fetal, regulan la inmunidad local contra agentes infecciosos, modulan la producción hormonal placentaria y el remodelado del tejido endometrial durante la invasión trofoblástica ([Wilczynski, 2005](#)). Según la hipótesis que postula Wegmann ([1993](#)), la actividad Th1 productora de interleuquina- 2 (IL-2), interferón gamma (IFN- γ) y factor de necrosis tumoral (TNF) es incompatible con una preñez viable ([Chaouat, 2002](#)), debido a que pueden llevar a la muerte de la unidad feto-placentaria al activar la inmunidad mediada por células. El IFN- γ promueve el desarrollo de linfocitos T CD8⁺ citotóxicos y células NK, y además inhibe a los linfocitos B. La respuesta Th1 además es efectiva en el control de infecciones intracelulares y es indispensable para activar el rechazo de injertos.

Por lo contrario, los linfocitos Th2 se caracterizan por ser fuente de IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13, que están relacionadas con el normal desarrollo de la gestación por generar un microambiente adecuado para el embrión o feto. La progesterona favorece la aparición de un perfil Th2 y disminuye las citoquinas Th1. La respuesta inmune materna esta inclinada hacia una inmunidad humoral y no celular, ya que esta es mediada por

células efectoras cuyas citoquinas liberadas son perjudiciales para el feto (Wegmann, 1993). Las citoquinas Th2 participan en el control de parásitos extracelulares y estimulan la inmunidad mediada por Ac. Su ubicación y distribución depende del órgano del tracto reproductor considerado (Parr y Parr, 1991).

La IL-12 induce la diferenciación de las células Th0 hacia un perfil Th1, de manera contraria la IL-4 favorece la diferenciación hacia un perfil Th2, anulando la respuesta citotóxica, con la participación de IL-6 e IL-10 (Lim y col., 2000; De los Santos y col., 2005).

En condiciones normales hay un equilibrio Th1/Th2; aunque dependiendo del estímulo, la respuesta se inclinará hacia uno u otro tipo. Ambos grupos de citoquinas se inhiben mutuamente, teniendo funciones antagónicas. La liberación de IFN- γ inhibe la vía Th2 y, por lo contrario, la producción de IL-10 puede inhibir la vía Th1. Por lo tanto, durante el desarrollo embrionario las citoquinas Th2 inhiben la respuesta Th1, permitiendo una gestación normal, pero esto conlleva a un aumento en la susceptibilidad a ciertas infecciones intracelulares (Wegmann y col., 1993). Entonces, según la relación Th1/Th2, hay citoquinas que van a favorecer el desarrollo del feto y embrión, llevando a cabo una preñez exitosa, y otras que serán perjudiciales para la gestación causando la muerte embrionaria o fetal. La inclinación hacia un perfil Th2 depende de las hormonas que se encuentran de manera predominante durante la gestación. Los estrógenos y la progesterona favorecen la desviación hacia una respuesta inmune

humoral, beneficiosa para mantener la gestación. Los estrógenos aumentan la actividad de las células Treg, reducen la actividad de células uNK y TNF e inducen un incremento de las citoquinas tipo Th2. Por su parte, la progesterona reduce las citoquinas de tipo Th1 y a su vez estimula la producción de IL-10, citoquina beneficiosa para el mantenimiento de la gestación ([Entrican, 2002](#)). También la progesterona inhibe la generación y la actividad de TNF- α y de las células uNK. Por lo tanto, el aumento de los niveles de los esteroides sexuales durante la gestación favorece la tolerancia materna al inhibir la activación de una respuesta citotóxica ([Woudwyk, 2013](#)) y al aumentar la producción de citoquinas del perfil Th2, demostrando una vez más la desviación hacia una respuesta humoral ([Baraño, 2010](#)).

Existen evidencias de que en determinados momentos de la gestación, como en la implantación y el parto, participan citoquinas Th1. Durante la implantación, intervienen moléculas como la IL-1, el factor inhibitorio de leucemias (LIF), el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) y el IFN- γ . Asimismo, durante el parto se evidencia un aumento de citoquinas como TNF, IFN γ , IL-8 e IL-12, lo que lleva a la activación de macrófagos, neutrófilos y células NK. De dichas observaciones se termina de definir el concepto de “balanza Th1/Th2” que se produce en el transcurso de la preñez.

La desregulación en los niveles de citoquinas puede comprometer la continuidad del conceptus ([Kruse y col., 2000](#); [Spencer y col., 2004](#); [Hauguel-de Mouzon y col., 2006](#); [Krzymowski y col., 2012](#); [Woudwyk y col.,](#)

2012). En concordancia, diversos desórdenes reproductivos de mamíferos placentarios surgen como consecuencia de un desbalance en los niveles de determinadas citoquinas en la unidad feto-placentaria o solo en la madre, a causa de la activación de receptores PRR (receptores de reconocimiento de patrones) por determinados patógenos (Zenclussen, 2005; Zenclussen y col., 2007).

En los focos de infección viral, tanto en la placenta equina como en la murina, se desarrolla un notorio proceso inflamatorio y la infiltración diferencial de células inmunitarias que podría reflejarse en cambios en los niveles de citoquinas circulantes. En algunas enfermedades se vio que hay un redireccionamiento de la respuesta inmunitaria uterina desde una dominada por un perfil de citoquinas Th2, protectorio para la preñez, hacia otro predominantemente Th1, que facilita la eliminación del microorganismo pero también puede generar el aborto (Quinn y col., 2002; Innes y col., 2005; Ge y col., 2008). Durante las infecciones virales también existe un perfil de citoquinas Th1 (Coombs y col., 2006); sin embargo, hasta el momento no se había estudiado si estas intervienen en la interrupción de la gestación en animales infectados por el EHV-1.

Relación Th17/Treg

El equilibrio fisiológico Th1/Th2 es insuficiente para explicar el mecanismo inmunológico materno que ocurre durante la gestación, existe otro subconjunto de células T CD4+, llamadas T *helper* 17 (Th17) y células T

reguladoras, con acciones opuestas, pero que comparten una compleja relación, por lo que se ha convertido en el nuevo paradigma Th1/Th2/Th17/Treg ([Peck y col., 2009](#)). Además de las células efectoras, las células Th están reguladas por las células Treg. Su capacidad para producir citoquinas es suprimida por citoquinas inmunoreguladoras, tales como el factor de crecimiento transformante (TGF)- β y la IL-10, o por interacción de célula a célula.

Por otra parte, la IL-6 tiene un papel muy importante en la regulación del equilibrio entre las células Th17 y las células Treg, ya que induce el desarrollo de células Th17 a partir de células T CD4+ *naïve* junto con TGF- β . En contraste, la IL-6 inhibe la diferenciación de Treg inducida por TGF- β ([Saito y col., 2010](#)).

Las células Th17 producen una citoquina inflamatoria, la IL-17, y juegan un papel crítico en la inducción de la inflamación tisular asociada al rechazo de trasplantes, a enfermedades autoinmunes y a casos de abortos espontáneos ([Nakashima y col., 2010](#); [Liu y col., 2011](#)). Debido a que la cavidad uterina no es completamente estéril, las células Th17 desarrollan una respuesta inmune contra los patógenos extracelulares, como hongos y bacterias, siendo por lo tanto estos linfocitos necesarios, pero a la vez si la respuesta inflamatoria es excesiva puede causar el rechazo del embrión transformándose en perjudicial para el mantenimiento de la preñez ([Saito y col., 2010](#)).

Los datos observados muestran una mayor prevalencia de células Th17 en sangre y decidua en pacientes humanos con abortos espontáneos recurrentes. Estas observaciones sugieren que las células Th17 podrían tener un rol clave en el rechazo fetal inmunológico ([Wang y col., 2010a](#)).

El factor de transcripción ROR γ t (*related orphan receptor*) se expresa específicamente en las células Th17 murinas y promueve su diferenciación, siendo necesario para la síntesis de IL-17 por parte de dichas células ([Wang y col., 2010b](#)).

La función de las células T efectoras, como Th1, Th2 y células Th17, es regulada por la acción de las células Treg CD4⁺ CD25⁺ ([Saito y col., 2010](#)). Estas células poseen actividad inmunosupresora, manteniendo así la homeostasis del sistema, lo que favorece la tolerancia materno-fetal ([XingL y col., 2010](#); [Erlebacher, 2010](#)). Son potentes supresores de la generación y función efectora de la respuesta inmune inflamatoria mediada por células ([Aluvihare y col., 2004](#)).

Inicialmente las células Treg fueron relacionadas a la prevención de las reacciones autoinmunes por silenciar la acción de los linfocitos T y B autoreactivos ([Woudwyk y col., 2013](#)). Los estudios realizados por Robertson y col. ([2009](#)) y Moldenhauer y col. ([2009](#)) sugieren un rol para el líquido seminal en la activación de la respuesta inmune materna a través de las células Treg antes de la implantación del embrión; por lo tanto, se evidencia que las células Treg son específicas para los antígenos MHC paternos. A su vez, también se observó un aumento de dicha población celular durante la

gestación temprana, produciéndose un pico en el segundo trimestre y una posterior disminución gradual (Heikkinen y col., 2004; Somerset, 2004). Las células Treg contribuyen con la tolerancia ya que inhiben la activación, la expansión clonal, la producción de citoquinas en las células T CD4+ y T CD8+, y la diferenciación en células efectoras de los linfocitos T y B. Además, suprimen la función de las células NK, los macrófagos y las células dendríticas resultando en la inducción de un estado de tolerancia (Sakaguchi, 2005).

La expresión del gen del factor de transcripción *forkhead box P3* (Foxp3) es indispensable para la diferenciación y la funcionalidad de los linfocitos Treg. Las células Treg adquieren su fenotipo regulador en el timo o en la periferia a partir de células T *naïve* (Woudwyk, 2013). La IL-2 es vital e irremplazable para el desarrollo, la supervivencia y la función de las Treg (Fainboim, 2011). Las células Treg se encuentran elevadas en sangre y útero durante el estro, un hecho que se interpreta como un requisito para el establecimiento de la preñez, debido a la creación de un microambiente adecuado que permite la tolerancia hacia el embrión y luego se mantienen aumentadas durante toda la gestación (Zenclussen y col., 2006). Luego la cantidad de células Treg comienzan a descender hasta alcanzar los niveles basales después del parto (Aluvihare y col., 2004; Schumacher y col., 2007). De todos modos, se ha afirmado que las células Treg se expanden sistémicamente y que la presencia de aloantígenos fetales no es necesaria para la expansión de las células dentro del compartimento linfoide

secundario durante la preñez. No obstante, la expresión de aloantígenos fetales conduce a un incremento del número de células Treg que producen elevados niveles de moléculas protectoras ([Zenclussen, 2006](#)) y la consecuente supresión específica de la reactividad de los Ac antialoantígenos paternos. En el caso de ratonas preñadas, las células Treg específicas contra Ag paternos proliferan 3 días luego del coito en los linfonodos que drenan el útero. Estas células Treg específicas, rápidamente se dirigen hacia el útero gestante y proliferan en él, de este modo se induce un estado de tolerancia hacia los Ag paternos durante la preñez temprana ([Saito y col., 2010](#)). Se ha propuesto que las células Treg protegen a las células fetales mediante la inducción de la expresión de moléculas reguladoras inmunes tales como TGFb, factor inhibidor de la leucemia (LIF), hemooxigenasa-1 (HO-1) e IL-10 en la interfase materno-fetal ([Zenclussen y col., 2006](#)).

En resumen, las observaciones sugieren que las células Treg son eficaces en la interfase materno-fetal para evitar el rechazo inmunológico del feto y para crear un microambiente privilegiado de tolerancia ([Zenclussen y col., 2006^a](#)). En el caso contrario, la deficiencia de células Treg en la gestación induce el aborto, como fue comprobado en un modelo murino bien establecido ([Zenclussen, 2005](#)).

Por lo tanto, ante lo expuesto, se puede observar que cambios en el patrón de citoquinas producidas por células T CD4 + juegan un papel

importante en el equilibrio Th1/Th2/Th17/Treg que comprometen la continuidad de la gestación.

Células inmunoreguladoras

Durante la preñez, el útero es un órgano enriquecido con **células uNK**, que son específicamente reclutadas al sitio de unión de la placenta y constituyen la subpoblación más abundante de leucocitos en la decidua basal murina ([Zhang y col., 2011](#); [Jabrane–Ferrat y col., 2014](#)). Estas células actúan coordinadamente para controlar el desarrollo e invasión del trofoblasto, el desarrollo de la angiogénesis y a su vez regular la inmunidad local. Se caracterizan por producir elevadas concentraciones de factores de crecimiento angiogénicos, los que son muy importantes en los procesos de placentación e implantación ([Saito y col., 2008](#)). Por otro lado, estas células mantienen la integridad de la decidua y protegen al feto contra patógenos externos, por lo que son cruciales para el desarrollo de una gestación exitosa.

Las uNK han sido estudiadas en detalle en la decidua del ratón ([Croy y col., 2009](#)). Se observó que se encuentran en elevadas concentraciones durante la primera mitad de la gestación y posteriormente declinan hasta estar prácticamente ausentes en la gestación a término ([Dallenbach-Hellweg y Nette, 1964](#)). Las células uNK se originan a partir de *stem cells* y solo se encuentran en el útero gestante, migrando a partir de los linfonodos y el bazo como células pluripotenciales ([Chantakru y col., 2002](#)), por lo que la

maduración de las células se produce en el útero, en donde ocurre la formación de sus gránulos citoplasmáticos. Empiezan a observarse al 5° día de gestación en la decidua mesometrial (*decidua basalis*) de cada sitio de implantación (Croy y col., 1997), posteriormente proliferan y aumentan de tamaño hasta alcanzar entre 40 y 100 μm de diámetro. Las células uNK granulares se ubican en una zona denominada triángulo mesometrial o “agregado linfoideo mesometrial de la preñez” (MLAp) (Croy, 1999). A los días 8-10 de la gestación, las uNK se hacen muy numerosas. Al día 12 empieza a disminuir su número y hacia el día 13 solo están presentes en el triángulo mesometrial (Moffet y Loke, 2006). A partir del día 15 comienzan a morir por apoptosis y no están presentes en el momento del parto (Stewart y Peel, 1980). Su importancia se debe a su capacidad para participar en todas las etapas de la placentación, que incluye la invasión trofoblástica en el endometrio materno y la remodelación vascular uterina, eventos que contribuyen a los cambios fisiológicos del endometrio mesometrial en un ambiente estromal único llamado decidua basal. Las células uNK, como ya mencionamos producen un factor proangiogénico, llamado factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), responsable de su actividad no citotóxica. Las células uNK y las trofoblásticas de la placenta se comunican y establecen una cooperación activa para contribuir al proceso crítico de remodelación de las arterias espirales, reduciendo el espesor de la túnica media por migración de las células musculares lisas y la dilatación de la luz vascular para que de esta manera el flujo sanguíneo hacia la placenta sea

mayor ([Matson y col., 2014](#)). Se produce el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos a partir de los vasos preexistentes en el proceso de angiogénesis. La regulación de la respuesta angiogénica en la decidua depende de un delicado balance entre señales inhibitoras y activadoras. Las células uNK y las células trofoblásticas producen factores de crecimiento y citoquinas que regulan las respuestas celulares endoteliales durante la gestación. Este proceso es necesario para la placentación, la regulación inmune y para remodelar el suministro de sangre al feto ([Barrientos y col., 2009](#)). Algunas de las citoquinas que secretan son el IFN- γ , TNF- α , IL-18 e IL-27 ([Croy y col., 2003](#)). Las células trofoblásticas expresan receptores para muchas de las citoquinas secretadas por las células uNK, lo que indica que tienen una influencia significativa en el comportamiento del trofoblasto durante la implantación, limitan su capacidad invasiva para evitar una penetración excesiva en el endometrio. A su vez, producen TGF- β que inhibe a los linfocitos T que reconocen a los antígenos paternos. Por otro lado, se observó que las células uNK, mediante la secreción de INF- γ , promueven la tolerancia inmune que conlleva a una gestación exitosa al suprimir la acción de las células Th17. La técnica histoquímica del Ácido Peryódico-Schiff (PAS) es muy utilizada para la detección de carbohidratos en los tejidos y permite reconocer a las células uNK debido a la presencia de numerosos gránulos citoplasmáticos. Sin embargo en su trabajo, [Woudwyk \(2013\)](#), la técnica que más usa es la marcación con la lectina DBA ([Dolichos biflorus](#)) que marca la membrana plasmática además de los gránulos citoplasmáticos.

Por todo lo expuesto, se concluye que las células uNK contribuyen a crear un ambiente favorable para la placentación y al mismo tiempo están equipadas con el potencial citotóxico para combatir las infecciones intrauterinas.

Las **células dendríticas** son células presentadoras de antígenos que responden a señales recibidas del microambiente tisular y que activan a los linfocitos T vírgenes, induciendo su expansión clonal y su diferenciación en perfiles efectores particulares produciendo una respuesta inmune protectora cuando es necesario. Las CD adquieren diferentes fenotipos según el tipo de citoquinas producidas en su entorno, ya sea en condiciones fisiológicas como en respuesta a las señales microbianas ([Mowat, 2003](#)). Las CD del útero pueden tomar dos caminos, por un lado iniciar una fuerte respuesta inmune, dependiendo de su estado de maduración al momento de la presentación del antígeno, o contrariamente pueden inducir tolerancia frente a antígenos. En el caso de una gestación normal, la prostaglandina E2 (PGE2), el (TGF) β , la progesterona, las células NK y los macrófagos favorecen la inducción de CD tolerogénicas con producción de IL-10 inclinando la respuesta inmune hacia un perfil Th2 con generación de células Treg. De lo contrario, al haber una falla en la gestación se puede producir una infiltración de células NK con un aumento de IFN- γ y de macrófagos productores de TNF, esto provocaría la activación de las CD, con el consiguiente aumento de células Th1, lo cual puede desencadenar un aborto debido a la apoptosis de las células trofoblásticas ([Arias y Villegas, 2010](#); [Blois y col., 2007](#)).

Los **macrófagos** son alrededor del 20-30% de los leucocitos presentes en la decidua humana. En condiciones normales, durante la implantación del embrión hay un aumento de células apoptóticas en el endometrio que promueven en los macrófagos la producción de diferentes citoquinas como la IL-10 que inhiben la actividad citotóxica de los linfocitos T. Por el contrario, cuando la gestación se desarrolla bajo condiciones anormales, puede existir un aumento excesivo de células endometriales apoptóticas, esto puede sobrepasar la capacidad de los macrófagos para eliminarlas y promover la producción de citoquinas pro-inflamatorias que conllevan a la interrupción de la gestación. Por lo tanto un número elevado de macrófagos en el útero puede asociarse con la pérdida de la preñez ([Baraño, 2010](#)).

Los **mastocitos** son células del sistema inmune que contienen numerosos gránulos citoplasmáticos metacromáticos grandes, que contienen citoquinas, histamina y otros mediadores, y que pueden distinguirse fácilmente con las técnicas histológicas de Giemsa y Azul de Toluidina. Estas células participan en la permeabilidad vascular, protegen las superficies mucosas y regulan la contractibilidad del miometrio. Su localización en ratonas preñadas es en el triángulo mesometrial y en el miometrio ([Gibbons y Chang, 1972](#)), también pueden encontrarse en el perimetrio y, en raras ocasiones, en la zona externa de la decidua ([Widayati y col., 2004](#)).

Por lo tanto, podemos concluir que existen una serie de mecanismos inmunológicos involucrados en la interfase materno-fetal, que en conjunto contribuyen al mantenimiento y desarrollo de una gestación exitosa y además, que ninguno de ellos es exclusivamente indispensable para generar el estado de tolerancia inmunológica hacia el feto, sino la relación entre todos ellos ([Vázquez-Rodríguez, 2011](#)).

MODELO EXPERIMENTAL PARA EL ESTUDIO DE ALFAHERPESVIRUS EQUINO 1

La mayoría de las investigaciones relacionadas con el potencial abortigénico y la virulencia de cepas de EHV-1 son realizadas con la cepa murina BALB/c. Este modelo experimental evita las dificultades prácticas y económicas de trabajar con equinos, debido a que el desarrollo de ensayos en el hospedador natural posee un costo muy elevado, requiere un gran número de animales, en lo posible libres del virus y de patógenos específicos (calidad *SPF*, del inglés *Specific Pathogen Free*), además de la dificultad de su manejo, la necesidad de una amplia disponibilidad de espacio, el requerimiento de personal veterinario calificado y la imposibilidad de estandarizar las condiciones medio-ambientales. A esto se le adiciona el seguimiento durante un período prolongado como es el de la preñez.

Por todas estas razones, el desarrollo de un modelo animal experimental permite la extrapolación al hospedador natural y la reducción del número de experimentos en estos animales. Dentro de las ventajas que presenta el uso del modelo murino se encuentra que está bien definido en cuanto a sus características genéticas, posee un estricto control de patógenos (*SPF*), el mantenimiento es de bajo costo, su manejo sencillo y posee una fácil estandarización de las condiciones ambientales. Asimismo, la gestación tiene una duración de tan solo 21 días y en el mercado hay gran disponibilidad de reactivos para los ensayos de interés.

Con las experiencias de Awan y col. (1990 y 1991) se logró reproducir la enfermedad respiratoria utilizando ratones BALB/c anestesiados e inoculados por vía intranasal, la ruta natural de entrada del virus. Posteriormente, los esfuerzos fueron orientados a determinar si existían cepas de ratones más susceptibles a la infección que otras (Alber y col., 1995), a comprobar si se podía reproducir la infección abortigénica (Walker y col., 1998 a, 1998b) a investigar la respuesta inmune (Awan y col., 1995 ; Bartels y col., 1998), a ensayar agentes antivirales (Awan y Fields, 1993), a estudiar el establecimiento de la latencia y de la reactivación (Field y col., 1992) y a analizar diferentes cepas virales (Van Woensel y col., 1995; Colle y col., 1996; Galosi y col 2004; Galosi y col 2006) y nuevos inmunógenos (Tewari y col., 1994, 1995; Osterrieder y col., 1994; Stokes y col., 1996, Kukreja y col., 1998; Ruitenberg y col., 1999; Fuentealba y col 2014; Zanuzzi y col., 2014)

El modelo ya estandarizado y elegido para este trabajo de tesis repite con similitud los signos clínicos y las lesiones a nivel histológico que ocurren en el hospedador natural en todos los sistemas, incluido el reproductor (Awan y col., 1990, 1991, 1995; van Woensel y col., 1995; Walker y col., 1999^a, 1999^b; Galosi y col., 2004, 2006). A pesar de las diferencias histológicas entre las placentas de equino y de ratón (clasificadas como epitelio/endoteliocorial transitoria y hemocorial, respectivamente), existen algunas similitudes en el reclutamiento de células inmunes y en la expresión

de citoquinas y receptores, por lo que se cree que algunos de los mecanismos que intervienen en la inmunología de la gestación no diferirían entre ambas especies ([Wooding y Burton, 2008](#); [Croy y col., 2009](#)).

Para el desarrollo del modelo animal experimental es de gran importancia la correcta elección del anestésico a utilizar en los ensayos experimentales, ya que el mismo puede modificar la respuesta a la infección y generar resultados que conduzcan a conclusiones erróneas ([Eöry y col., 2013](#)). El uso del éter no está recomendado debido a que es inflamable, irritante de las vías respiratorias, y genera un elevado estrés durante el período de inducción ([AVMA Panel on Euthanasia, 2001](#)). Como consecuencia, el modelo desarrollado por Awan y col. (1990) fue ligeramente modificado por el reemplazo del éter con isoflurano. Este nuevo modelo se utilizó con éxito en diferentes trabajos que evaluaron distintos aspectos de la infección por EHV-1 ([Csellner, 2000](#); [von Einem, 2007](#); [van de Walle, 2007](#); [van de Walle, 2008](#)).

Básicamente las razones por las cuales se adoptó definitivamente al modelo ratón para el estudio de EHV-1 fueron las siguientes:

a) similitud en el tropismo tisular: tanto en el equino como en el ratón el virus puede ser aislado de diversos órganos, es decir produce una infección de tipo sistémica. Los primeros estudios realizados indicaron que el ADN del virus fue detectado por PCR en numerosos órganos ([Baxi y col., 1996](#)), aunque no se lo aisló del bazo y del hígado del ratón ([Awan y col., 1990](#)). Sin

embargo, estudios más recientes, permitieron demostrar el aislamiento viral también a partir de estos órganos (Zanuzzi y col., 2014). En el caso de hembras equinas preñadas e infectadas experimentalmente, no todos los fetos abortados resultan positivos al virus, hecho que podría estar relacionado a otros factores. En ratonas preñadas se hallaron resultados similares aunque al tratarse de hembras multíparas, algunos fetos resultaron negativos mientras que otros fueron positivos al virus (Walker y col., 1999).

b) aparición de signos clínicos respiratorios y nerviosos: el periodo de incubación para el equino es, generalmente, de 2 días y los signos respiratorios característicos se resuelven aproximadamente a los 12 días pi. En los ratones se observa dificultad respiratoria, pelo hirsuto, decaimiento, cambios generales de comportamiento, conjuntivitis ocasional; por lo general todos estos signos desaparecen totalmente a los 6 días pi (**Figura 15**).

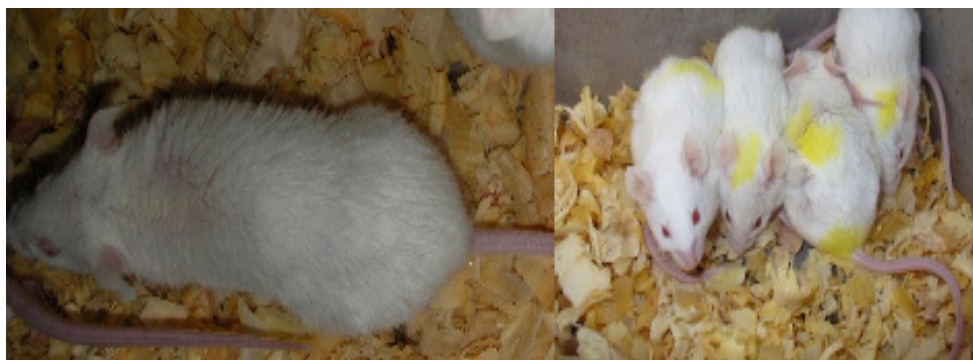


Figura 15. Ratones BALB/c infectados por alfa herpesvirus equino 1 (Observar el aspecto característico del pelo y el agrupamiento con sus congéneres).

c) efecto sobre la preñez: en la infección experimental de ratones, los resultados dependen del momento de la infección: en caso de producirse en

el primer tercio de preñez se observa reabsorción fetal. La infección durante la gestación media lleva a la expulsión prematura de fetos muertos o al nacimiento de neonatos que mueren en el primer día de vida. Cuando la infección se produce en el último tercio de la gestación puede observarse que el tamaño de los neonatos es menor al de los controles ([Awan y col., 1995](#); [Walker y col., 1998b](#)).

d) cambios en las células sanguíneas y eliminación viral: la eliminación del virus en ratones es similar a lo que sucede en equinos, aunque también depende de la dosis y de la cepa viral utilizada para la infección ([Awan y col., 1990](#); [Inazu y col., 1993](#); [Walker y col., 1998a](#)). Con respecto a la viremia existen datos dispares, algunos autores citan periodos de viremia de 5 a 8 días, y otros determinaron que los periodos son más cortos (1-2 días) o que es indetectable ([Walker y col., 1999](#); [Zanuzzi y col., 2014](#)).

e) lesiones histopatológicas observadas: las lesiones pulmonares se caracterizan por alveolitis y bronquiolitis, presencia de cuerpos de inclusión, necrosis focal y agregados de células inflamatorias. El endometrio de hembras preñadas está congestivo con severos cambios vasculares, áreas de isquemia asociadas con necrosis e infiltración perivascular de células inflamatorias ([Smith y col., 1992](#)). En las placentas de ratonas se ha descrito congestión, necrosis y atrofia de la capa media del trofoblasto entre los 2 y 4 días pi ([Walker y col., 1998b](#)), tal como se observó en la placenta equina ([Smith y col., 1992](#)). En el caso de muerte perinatal en ratones se ha observado efecto citopático típico los epitelios bronquiolares aunque no se

han descrito lesiones en fetos analizados antes de la fecha de parto ([Walker y col., 1998b](#)).

f) latencia: como otros herpesvirus, luego de la infección primaria se ha descrito como sitio de latencia al ganglio trigémino, tanto en el equino como en el ratón, aunque en este modelo experimental también ha sido detectado por PCR a partir del bulbo olfatorio ([Baxi y col., 1995 y 1996](#)).

Como conclusión, la existencia de aborto en yeguas y ratonas infectadas con el virus y la semejanza en la patogenicidad de las distintas cepas cuando infectan ambas especies, apoyan el empleo de este modelo experimental para profundizar los estudios de la enfermedad ([Awan y col., 1995; Walker y col., 1999a; Galosi y col., 2004](#)).

Por otro lado, se debe considerar que el efecto sobre el *conceptus* es altamente variable y también depende de la cepa de virus. Una discusión que permanece abierta es si el aborto es producido “primariamente” por la infección viral o por factores maternos, junto a la respuesta inmune acompañante. Toda esta información podría conducir a nuevas estrategias de inmunización en el hospedador natural.

GESTACIÓN EN EL MODELO MURINO

Cuando se utiliza el ratón BALB/c como modelo experimental de enfermedades que provocan muerte embrionaria, se debe considerar que naturalmente existe un 20% de infertilidad por causas genéticas y por factores ambientales ([Bronson y col., 1964](#)). El mayor porcentaje de pérdidas de preñez se da en la etapa crítica de gestación, previa a la implantación (desde la fertilización hasta el período en el cual se produce el reconocimiento e interacción madre-*conceptus*) ([Rugh, 1968](#)).

Los óvulos fecundados migran hacia el útero para comenzar el proceso de implantación y desarrollo del *conceptus*. A las 48 h del apareamiento, los fibroblastos endometriales fagocitan fibras de colágeno y se producen cambios degenerativos y apoptosis en el endometrio que permitirán la invasión del trofoblasto y la posterior implantación ([Bijovsky y col., 1992](#)). En el ratón el blastocisto se implanta en el útero aproximadamente a los 4,5 días pos coito ([Rugh, 1968](#)). La implantación es de tipo excéntrica, es decir, que ocurre en una pequeña invaginación de la luz uterina denominada cripta, ubicada del lado antimesometrial del endometrio. Durante los pasos iniciales de la implantación murina, las células del epitelio de las criptas mueren por apoptosis en respuesta a la interacción con el trofoblasto ([Parr y col., 1987](#)). Al mismo tiempo, las células trofoblásticas proliferan e invaden al endometrio. El tejido conjuntivo del endometrio en estos animales responde también a ese trofoblasto altamente invasivo, transformándose en un tejido especializado denominado decidua que contiene una amplia variedad de

células que incluye: células deciduales ricas en glucógeno (diferenciadas a partir de fibroblastos de la lámina propia del endometrio), macrófagos y células *uNK*. Los cambios endometriales que ocurren en respuesta a la implantación constituyen la reacción decidual o decidualización. En general el proceso de decidualización tiene como características: a) el rápido crecimiento y diferenciación de los fibroblastos del estroma uterino en células deciduales y b) la diferenciación y proliferación de células *uNK*. La progesterona es importante para la viabilidad y diferenciación de las células *NK* a *uNK*. Esta diferenciación comienza a partir del día 7 de gestación y se manifiesta por la acumulación de mediadores citolíticos como el factor de necrosis tumoral ($\text{TNF-}\alpha$) (Allen y Nilsen-Hamilton, 1998). La reacción decidual es particularmente evidente en la placenta de los roedores y de muchos primates, incluyendo al ser humano, pero no se observa o es mucho menos intensa en los mamíferos domésticos. La decidua actúa como soporte nutricional del embrión o feto y lo protege de la reacción inmunológica materna.

En el útero de una ratona preñada la reacción decidual comienza en la pared antimesometrial, en cada sitio de implantación y a las 48 h aproximadamente, incorpora a las regiones laterales y mesometrial. A los 6 días pos coito la luz del útero se cierra debido a la marcada reacción decidual. Las células deciduales rodean entonces a cada *conceptus*. La decidua antimesometrial alcanza su desarrollo máximo hacia el día 10, luego

regresa y forma la *decidua capsularis*. La región de la decidua que se encuentra en relación al mesometrio se denomina decidua mesometrial. Ésta alcanza su máximo desarrollo el día 12 de la gestación y comienza a regresar el día 14. En ese momento pasa a denominarse *decidua basalis*. Esta última es la zona de la decidua más desarrollada y persiste hasta el final de la preñez (Gu y col., 1994). Durante los primeros estadios del desarrollo en los roedores aparece un tipo de placenta denominada vitelina invertida en la que no participa el corion. Posteriormente, se desarrolla una placenta de tipo corioalantoidea, que es la definitiva (Stewart y col., 2000). Según la distribución de las vellosidades coriónicas, la placenta corioalantoidea del ratón es de tipo discoidea. El corion está constituido por el trofoblasto y el tejido mesenquimático derivado de la hoja parietal del mesodermo extraembrionario. La clasificación histológica de las placentas se basa en la cantidad de capas que conforman la barrera placentaria entre la sangre materna y la sangre fetal. De acuerdo con esta clasificación, la placenta murina es de tipo hemocorial, porque se pierden todas las capas maternas y existe contacto directo del epitelio coriónico (trofoblasto) con el lecho sanguíneo materno. Pese a que en las placentas hemocoriales la sangre materna contacta siempre con el trofoblasto, el número de capas de trofoblasto que separan la sangre materna de la fetal es variable. En el ratón y la rata existen tres capas del trofoblasto en contacto con la sangre materna (placenta trihemocorial) (Moffet y Loke, 2006).

En resumen, las capas que presenta la barrera placentaria murina, desde el feto hacia la madre, son las siguientes:

- 1) endotelio de los vasos fetales. Estos vasos provienen del alantoides.
- 2) mesénquima: constituye el mesodermo extraembrionario del alantoides.
- 3) tres capas de trofoblasto.

La sangre materna baña a las vellosidades coriónicas, formadas por tejido mesenquimático rodeado de células trofoblásticas, en algunos casos pueden observarse vasos maternos.

Luego de la implantación, el trofoblasto prolifera y se diferencia en 3 zonas:

- 1) el ectodermo extraembrionario: delimita el exoceloma y se expande para originar el corion, anexo extraembrionario que posteriormente va a formar parte del laberinto placentario.
- 2) el cono ectoplacentario: originado a partir de las células trofoblásticas que recubren al embrioblasto en el estadio de blastocisto.
- 3) las células gigantes: son células poliploides que se originan por endoduplicación, es decir, que replican su ADN pero no realizan mitosis. Derivan de las células más externas del cono ectoplacentario y rodean por completo al *conceptus*.

A los 8,5 días pos coito, el alantoides se fusiona con el corion para construir la membrana corioalantoidea. Luego, en el epitelio del corion comienzan a aparecer pliegues que marcan los sitios donde se van a introducir los vasos sanguíneos fetales provenientes del alantoides. Posteriormente, el corion junto a los vasos mencionados comienzan a experimentar una extensa ramificación para formar la zona de la placenta denominada laberinto. Mientras se desarrolla el laberinto, entre éste y la decidua, existe una zona de soporte estructural que se denomina espongiotrofoblasto. Los vasos sanguíneos maternos, que provienen de la decidua, atraviesan el espongiotrofoblasto para llegar al laberinto. Durante su trayecto por el espongiotrofoblasto, el endotelio es reemplazado por tres capas de células trofoblásticas (placenta trihemocorial) ([Rossant y Cross, 2001](#)).

Por lo expuesto y teniendo en cuenta que el modelo murino es útil para estudiar la infección por EHV-1, en este trabajo de tesis se realiza la infección experimental de ratones BALB/c y se evalúan algunos cambios celulares y moleculares a nivel de la respuesta inmune innata y adaptativa que podrían intervenir en la interrupción de la gestación por EHV-1. Los resultados obtenidos podrían ser útiles para comprender los sucesos que acontecen en la preñez de hembras equinas infectadas por el virus.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

El *alphaherpesvirus equino 1* genera en la placenta variaciones en los niveles de expresión de genes que codifican para citoquinas y en las células inmunes, cambios que comprometen la continuidad de la gestación. La magnitud de estos cambios se relaciona con la intensidad de las lesiones en el feto, la placenta y/o el útero.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Determinar cambios celulares y moleculares a nivel de la respuesta inmune innata y adaptativa que intervengan en la interrupción de la gestación por EHV-1.

Objetivos específicos:

- Analizar en la placenta de ratones BALB/c infectados con una cepa abortigénica de EHV-1, los posibles cambios cualitativos y cuantitativos en la expresión de genes que codifican para citoquinas.
- Describir la participación de células uNK que existen en animales infectados y no infectados.
- Evaluar cambios vasculares y en la proliferación y muerte celular en las placentas infectadas.

- Describir las lesiones producidas en los pulmones, el útero y la placenta.
- Relacionar la intensidad de los cambios moleculares con las lesiones producidas en los pulmones, el útero y la placenta.

MATERIALES Y MÉTODOS

Autorización del Proyecto

El diseño experimental fue aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP, bajo el código N° T35-6-13. Todos los procedimientos con animales se realizaron de acuerdo con los principios éticos para el uso de los animales de laboratorio del Consejo de Organizaciones Internacionales de Ciencias Médicas (CIOMS).

Animales de experimentación

Se utilizaron ratonas/es BALB/c libres de patógenos específicos provenientes del Bioterio de Laboratorio de Animales de Experimentación (LAE) de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata. Las hembras (de aproximadamente 6-7 semanas de edad) fueron preñadas en el Laboratorio de Virología. Los machos reproductores provinieron también del LAE. Los animales fueron alojados en un cuarto de aislamiento utilizado exclusivamente para este fin y especialmente adecuado con condiciones de temperatura, ventilación y fotoperiodo controlado. Se alojaron no más de tres hembras por caja de ~20 x 30 cm. Los machos reproductores se colocaron en un ambiente separado al de las hembras. El lecho se constituyó con viruta de madera blanca esterilizada y seca. El alimento balanceado y el agua (esterilizados por autoclave) se administraron *ad*

libitum. Para la ventilación, el extractor de aire funcionó 45 min seguidos por hora y la temperatura se mantuvo constante a 22°C. Con respecto a la iluminación los animales recibieron 14 h de luz y 10 h de oscuridad. La limpieza de las cajas se realizó 2 veces por semana.

Las hembras reproductoras pasaron una semana de ambientación en el cuarto aislador y luego se comenzó el trabajo con la sincronización del estro usando el efecto Whitten (1966). Las hembras fueron pesadas y luego colocadas con los reproductores en una proporción de no más de 3:1 durante 2 días y a primera hora de la mañana se controló la aparición de tapones vaginales considerándose a su presencia como el día 0 de preñez (**Figura 16**). El peso se controló a los 13 días (antes de la infección) para confirmar el estado de gravidez.

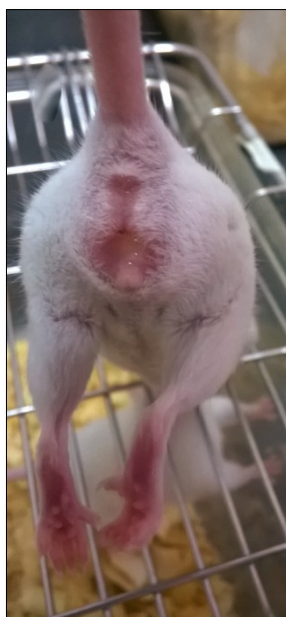


Figura 16. Presencia de tapón mucoso confirmatorio del coito y considerado como día 0 de preñez.

Virus y cultivos celulares

Para el desarrollo de este trabajo se utilizó la cepa argentina AR8 de EHV-1 aislada a partir del hígado de un feto abortado proveniente de un establecimiento ubicado en la ciudad de Magdalena (Provincia de Bs. As.) que en el año 1995 había registrado una tormenta de abortos (dato no publicado). Un estudio genómico realizado en el 2010 ([Fuentealba y col., 2011](#)) demostró que dicha cepa no posee cambios genómicos en comparación con las cepas abortigénicas Ab4 y V592 disponibles en el GenBank.

La cepa viral fue multiplicada en cultivos de la línea celular RK13 (riñón de conejo) adquirida en la Asociación Banco Argentino de Células (ABAC). Para el desarrollo de los cultivos se utilizó Medio Esencial Mínimo (MEM) (Gibco, Invitrogen, USA) suplementado con 2 mM de glutamina (Gibco, Invitrogen, USA), 100 UI/ml de penicilina – 100 µg/ml de estreptomycin (Ritchet, Buenos Aires, Argentina), 100 UI/ml de nistatina (Parafarm, Buenos Aires, Argentina) y 10 % de suero fetal bovino (SFB) (MEM-C). Para el mantenimiento de las células el SFB fue reducido a 2 % (MEM-M). Para la remoción de las mismas se utilizó tripsina (0,25 % p/v) – EDTA (0,2 % p/v) (Sigma – Aldrich, USA).

Se preparó un *stock* viral infectando monocapas celulares de no más de 24 h de crecimiento. Las células se observaron hasta que el efecto citopático lítico fue total (aproximadamente a las 36-48 h) (**Figura 17**). Se

levantaron con escobilla junto con el sobrenadante, se congelaron a -70°C y descongelaron (tres veces). Luego, se centrifugaron a 10000 rpm durante 20 min y el sobrenadante final se fraccionó en pequeños volúmenes y se conservó a -70°C para la inoculación de los animales. Previo a su uso en los animales, cinco muestras del *stock* viral se titularon por el método de Reed y Muench (1934) en diferentes días y el título viral promedio se expresó como $\text{DICC}_{50}/50\ \mu\text{l}$.

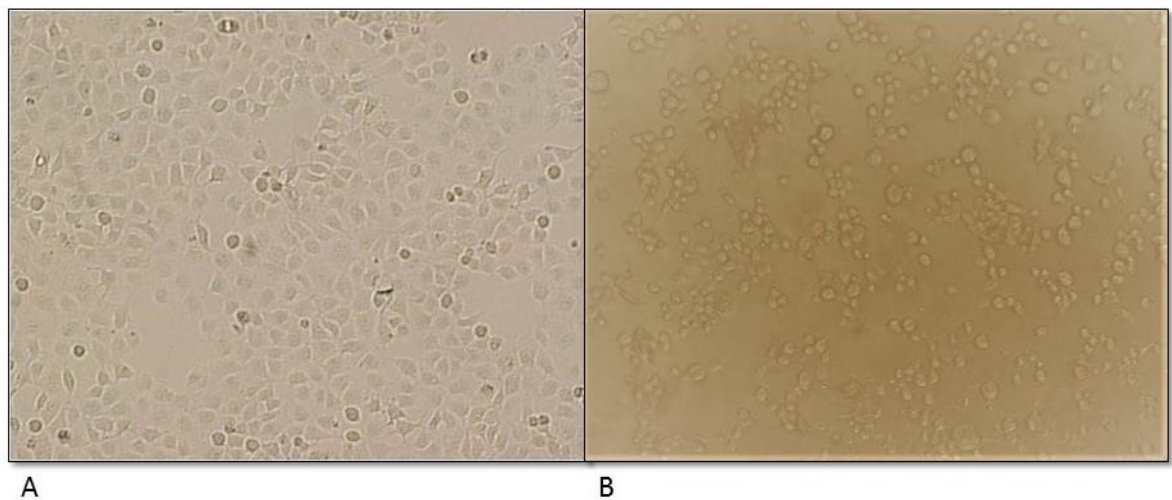


Figura 17. **A:** Células RK13 normales. **B:** Efecto citopático lítico de 36 h pi. Se observa además el redondeamiento celular y aumento de la refringencia.10X

ETAPA 1

Antes de evaluar las respuestas inmunes innata y adaptativa que podrían intervenir en la interrupción de la gestación por EHV-1 fue necesario seleccionar el tiempo pos infección a utilizar en la toma de las muestras. Se describe a continuación el procedimiento realizado.

Determinación del tiempo posinfección (pi) para estudiar la respuesta inmune local en la patogenia del aborto

Inoculación experimental

Una vez preñadas y en su segundo tercio de la gestación (día 13), las ratonas fueron infectadas por la vía intranasal bajo anestesia con isoflurano (Baxter Co., Deerfield, IL, USA), con $10^{5.45}$ DICC₅₀ en 50 µl de inóculo, (~250.000 partículas virales), previamente titulado y conservado a -70°C (**Figura 18**). Se evaluaron los posibles cambios a los días 5 y 6 pi. Por cada uno de los días pi se trabajó con un grupo “A” infectado (n=6) de hembras preñadas, un grupo “B” (n=4) de hembras preñadas sin infectar como control negativo. Se utilizó un grupo “C” (n=14) de hembras sin preñar, infectadas, como control positivo de infección. Se registró el peso de las hembras preñadas antes de la infección y al momento del sacrificio.



Figura 18. Inoculación intranasal de ratones de experimentación.

En todos los animales infectados (Grupo “A y C”) se les controló la presencia de signos clínicos en los diferentes días pi. Se sacrificaron dos animales por día (del 1ro al 7mo pi) del Grupo “C” y se tomaron muestras de sangre con anticoagulante, de los pulmones, del hígado y del bazo. De las hembras de los grupos “A” y “B” se tomaron muestras del útero y las unidades fetoplacentarias (UFP) a los días 5 y 6 pi. La **figura 19** indica el diseño experimental. Las experiencias fueron realizadas secuencialmente teniendo en cuenta la disponibilidad de hembras preñadas.

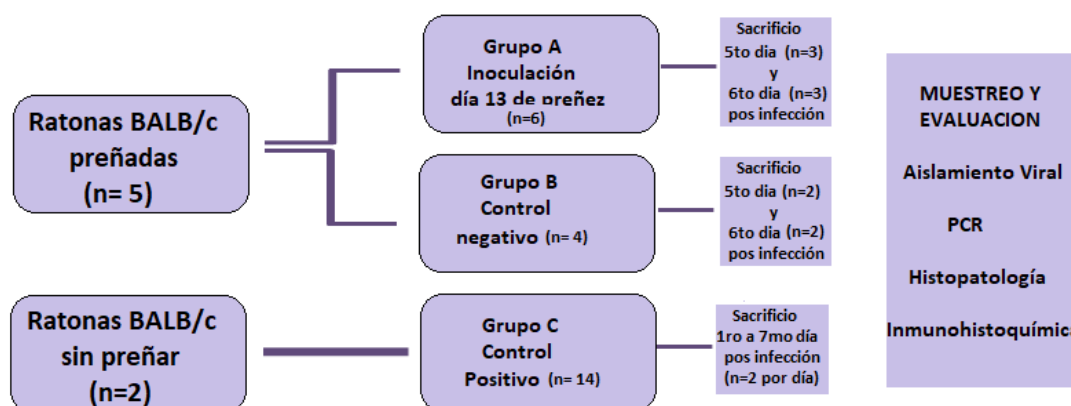


Figura 19. Diseño experimental de la etapa 1.

Las muestras de los Grupos “A” y “B” se acondicionaron según los estudios a realizar. La sangre fue utilizada directamente para la detección del virus mediante PCR; el pulmón izquierdo, la mitad de hígado, el bazo, parte del útero y el 50 % de las UFP (seleccionadas al azar) se procesaron para AV y PCR. Los trozos restantes de órganos y el otro 50% de las UFP se procesaron para su estudio histopatológico y la aplicación de técnicas IHQ.

Aislamiento viral

Las muestras de tejido se procesaron de acuerdo con los métodos convencionales para AV. En primer lugar, se lavaron con PBS y se prepararon homogenatos al 10% (P/V) de cada uno de los tejidos en MEM-M. Cada homogenato se centrifugó a 3000g por 10 min para eliminar restos celulares y luego se tomó el sobrenadante que se colocó en tubos descartables y se realizó una segunda centrifugación a 8000g durante 20

min. Los sobrenadantes finales se conservaron a -70°C hasta su utilización como inóculos. Todas las muestras procesadas se inocularon diluidas en base logarítmica 10, en MEM-M, desde 10^{-1} a 10^{-3} sobre células RK13 crecidas en microplacas de 24 pocillos (Greiner Bio-One). Se dejaron en incubación para favorecer la adsorción viral, por 2 h a 37°C y luego se completaron los pocillos con MEM-M. Las placas se controlaron diariamente para detectar la aparición de efecto citopático, y se realizaron tres pasajes ciegos de 7 días cada uno antes de considerar negativo el resultado de la muestra.

Reacción en cadena de la polimerasa

Los homogenatos puros de cada muestra y las células del tercer pasaje por aislamiento viral fueron procesadas para extracción de ADN con un *kit* comercial (Wizard Genomic DNA Purification Kit, Promega, Madison, USA).

La PCR fue realizada utilizando un par de *primers* específicos que amplifican un segmento de 369 bp del gen codificante de la gC de EHV-1.

5'-CAACAATCGGGGAGGCGTCATA-3' (posición 21,582–21,603)

5'-GTAGCATAGACTGGTACAGGGA-3' (posición 21,929–21,950)

La amplificación fue realizada en un termociclador *Master cycler Gradient* (Eppendorf) y consistió en las siguientes etapas: desnaturalización inicial por 5 min a 94°C, seguida de 40 ciclos a: 94°C por 1 min, 56°C por 1 min y 72°C por 90 seg. Los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa al 2% en *buffer* TBE (50 mM Tris pH 8.0, 50 mM ácido bórico y 1 mM EDTA) a 7 V/cm por 1 h, y luego se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron usando un transiluminador UV. El tamaño de los fragmentos fue comparado con un marcador de PM de 100 bp (PromegaLab., Madison, WI, USA) ([Galosi y col., 2001](#)).

Estudio histológico

El procesamiento del material comenzó con la deshidratación. Ésta consistió en pasajes en una serie de alcoholes de graduación creciente: alcohol 70°, 96° (dos pasajes) y 100° (dos pasajes). Como líquido intermediario se utilizó xilol (dos pasajes). Luego las muestras se impregnaron utilizando 3 baños en parafinas de alto punto de fusión (56°C a 58°C), mantenidas en estufa con temperatura constante. Se utilizaron barras de Leuckart para la inclusión final en parafina. Los bloques de parafina fueron adosados a un soporte de madera o en cassette de plástico, e identificados con la numeración correspondiente. De cada bloque se realizaron cortes seriados, de un espesor de 2 a 3 μ m, con un micrótopo semi automático LEICA RM2245. Se utilizaron portaobjetos convencionales para las técnicas histológicas e histoquímicas, mientras que para evitar el desprendimiento del material

durante alguno de los pasos de las técnicas de IHQ se utilizaron portaobjetos electrocargados positivamente (*Starfrost, Knittelglaser, Braunschweig, Alemania*). Para desparafinar y rehidratar los cortes se utilizaron dos baños de xilol y una batería de alcoholes de graduación decreciente hasta concluir en el agua destilada. Posteriormente, los cortes se colorearon con la técnica histológica tradicional de Hematoxilina y Eosina (HE) según los procedimientos de rutina (Bancroft y Stevens, 1990).

Detección del virus por inmunohistoquímica (IHQ)

La distribución tisular de las células infectadas se determinó por IHQ. Se procedió al desparafinado, la hidratación y el bloqueo de las peroxidasas endógenas. Se realizó recuperación antigénica de las muestras, para conseguir el “desenmascaramiento” de las ligaduras existentes en las cadenas proteicas del tejido originadas por la acción del formaldehído como fijador ([Zanuzzi y col., 2016](#)). Estas interacciones interferirían con la penetración y posterior unión de los Ac. La recuperación antigénica se realizó en un horno de microondas a temperaturas superiores a 100°C, colocando los cortes en *couplings* con una solución tamponada de citrato (pH 6) dos veces durante 5 minutos. Posteriormente, se dejó enfriar a los cortes a ta y luego de lavarlos con *PBS* se procedió a bloquear las uniones inespecíficas mediante la incubación con seroalbúmina bovina al 1%. Luego se realizó la incubación con un Ac primario anti-EHV-1, policlonal, producido en conejo, durante 1h a 37°C. El sistema de detección y amplificación utilizado fue el

EnVision® (*EnVision® + system HRP labelledpolymer anti-rabbit*, DakoCytomation, Carpintería, CA, EE.UU). El sistema EnVision® Dako consta de un polímero de dextrano marcado con la enzima peroxidasa y conjugado con inmunoglobulinas y, por lo tanto, con capacidad de unirse al Ac primario. La enzima peroxidasa, asociada al polímero, actúa sobre el agua oxigenada que se agrega junto con el sistema revelador, y se emplea a la 3-3'tetrahidrocloruro diaminobencidina (DAB) (DakoCytomation, Glostrup, Denmark) como cromógeno que precipitará donde ocurrió la unión Ag-Ac. El sitio positivo de la unión Ag-Ac se evidenció como un precipitado pardo. La coloración nuclear de contraste se realizó con hematoxilina (Eöry y col., 2013).

RESULTADOS ETAPA 1

Selección del tiempo pos infección para estudiar la respuesta inmune local en la patogenia del aborto

Todas las hembras de los Grupos “A” presentaron disnea leve y pelo hirsuto en los primeros 2-3 días pi. Tanto en los Grupos “A” y “B” no se detectaron variaciones de peso respecto a las esperadas para cada día de preñez. Las muestras de hígado, bazo, útero y UFP de las hembras del Grupo “A” de los días 5 y 6 pi no presentaron lesiones (**Figura 20 y 21**) y

fueron negativas a la IHQ para detección de Ag virales (**Figura 22**). Mediante la técnica de AV, luego de tres pasajes no se observó efecto citopático, y finalmente la detección del ADN viral por PCR también fue negativa.

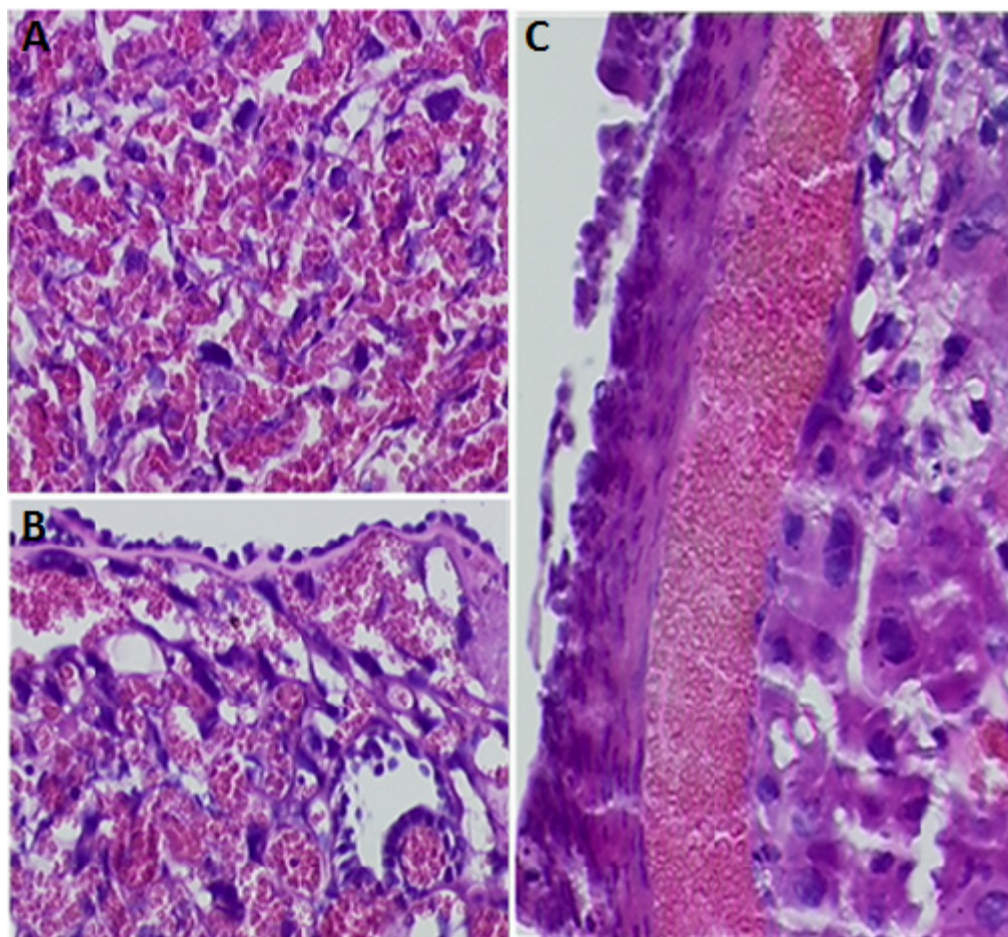


Figura 20. Placenta de hembra control negativa a los 6 días pi sin alteraciones vasculares ni cambios inflamatorios.HE. **A** y **B**. Zona de laberinto. 20x. **C**. A la izquierda: decidua y a la derecha: región de células gigantes y zona de espongiotrofoblasto.40x

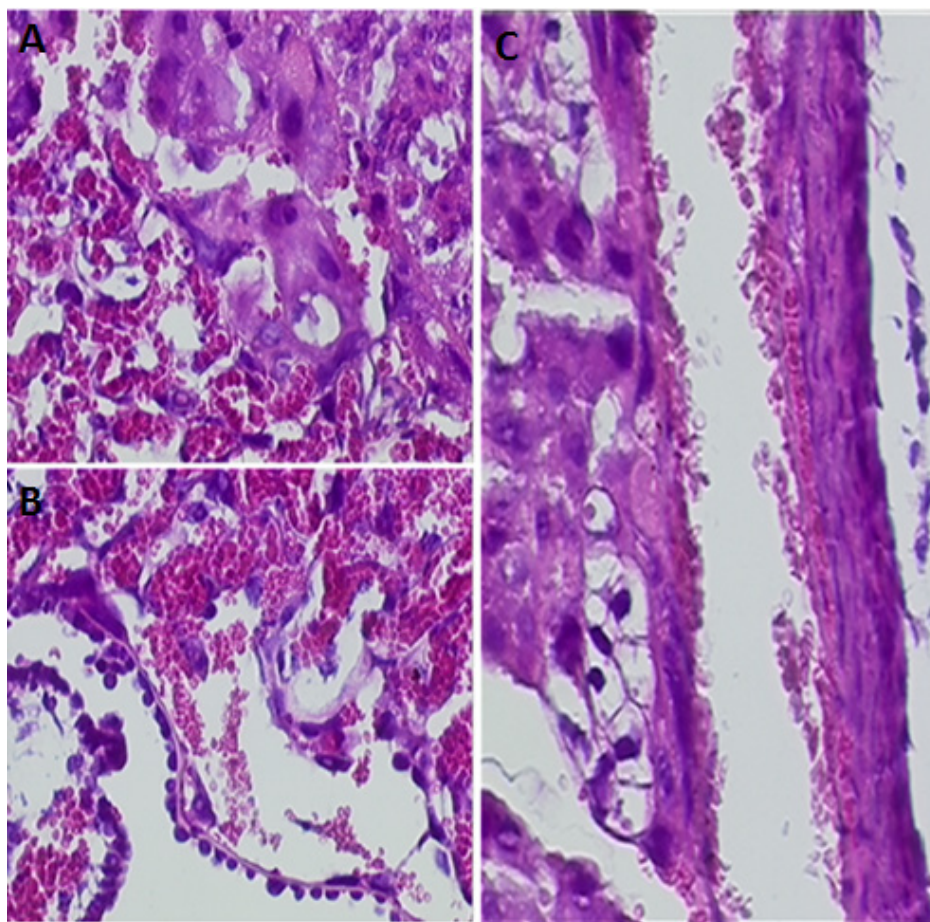


Figura 21. Placenta de hembra infectada, 6 días pi. HE. **A:** se observa zona de espongiotrofoblasto (derecha arriba) y zona de laberinto (izquierda abajo). 20x. **B:** zona de laberinto. 20x. **C:** a la izquierda: espongiotrofoblasto y a la derecha: laberinto. 40x.

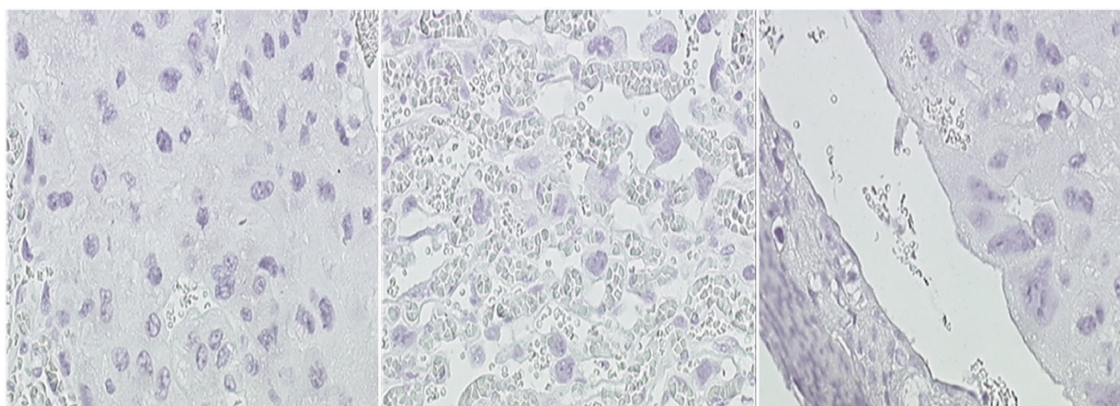


Figura 22. Placenta de hembra infectada día 6 pi (IHQ). No se detectaron células inmunohistoquímicamente positivas al EHV-1. 20x

En las hembras de los Grupos “C” se observó reacción inflamatoria leve peribronquiolar y vascular y se detectaron Ag virales en los bronquiólos hasta el día 4 pi (**Figura 23**). La PCR permitió demostrar la presencia de ADN viral en los pulmones hasta el día 4 pi y en plasma hasta el día 2 pi. El aislamiento viral en pulmones se registró hasta el día 4 pi, mientras que en el hígado, el bazo y el plasma hasta el día 2 pi. El efecto citopático fue confirmado por observación en fresco con microscopio invertido (**Figura 24**). La **tabla 2** resume los resultados hallados.

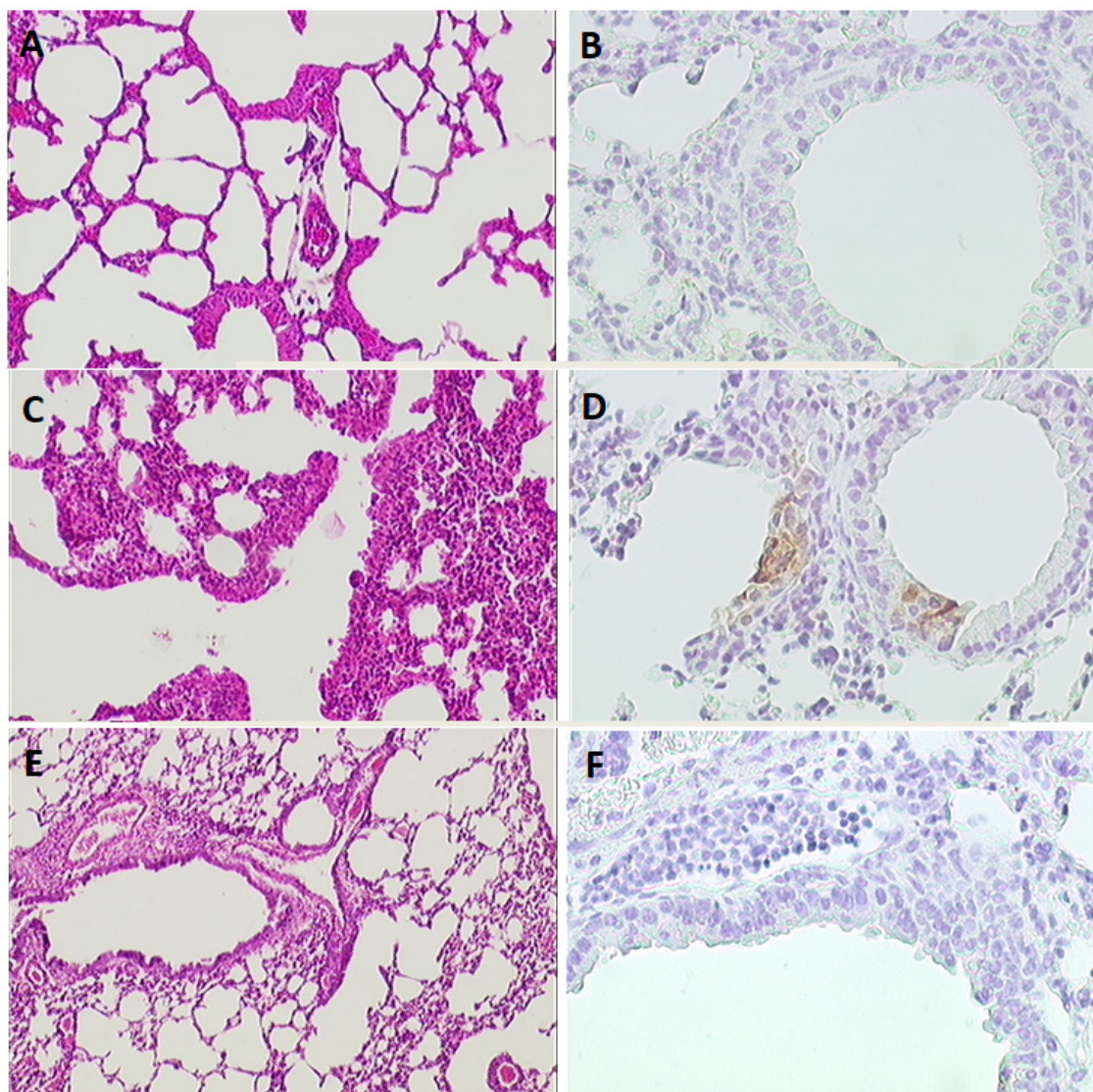


Figura 23. Pulmón de hembra preñada control negativo (**A y B**), control positivo de 3 días pi (**C y D**) y de hembra preñada infectada a los 6 días pi (**E y F**). HE (A, C y E) 10x, IHQ anti EHV-1 con DAB como revelador (B, D y F) 20x. D: El color marrón indica marca positiva.

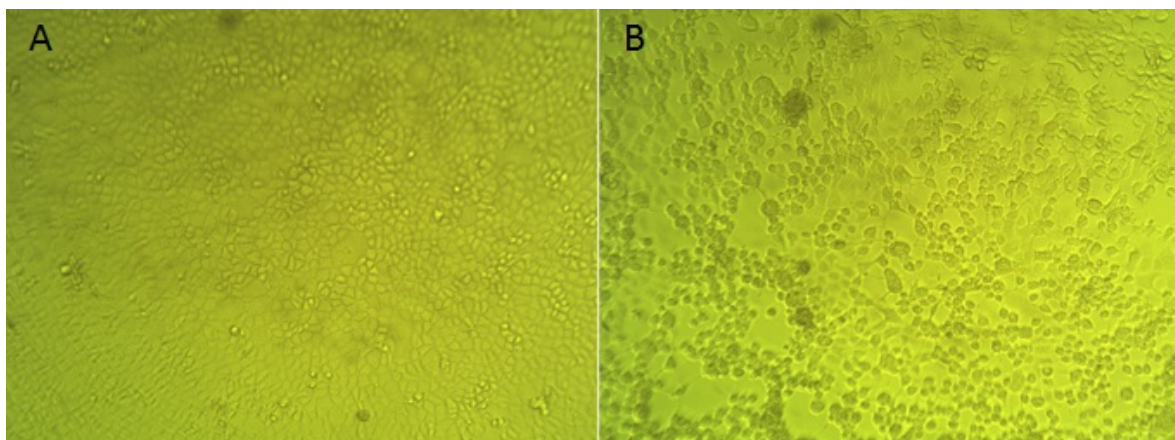


Figura 24. Aislamiento viral en monocapas de células RK13. **A.** Monocapa de células sin infectar. **B.** Células RK13 de 3 días de infección; se observa la presencia de efecto citopático lítico característico de EHV-1.

Tabla 2. Detección por inmunohistoquímica (IHQ), PCR y aislamiento viral en pulmón, hígado, bazo y plasma de animales controles positivos de infección (Grupo “C”).

Días pi	IHC			PCR				Aislamiento viral			
	P	H	B	P	H	B	PI	P	H	B	PI
1	X	-	-	X	X	X	X	X	X	X	X
2	X	-	-	X	X	X	X	X	X	X	X
3	X	-	-	X	-	-	-	X	-	-	-
4	X	-	-	X	-	-	-	X	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Referencias: P: pulmón; H: hígado; B: bazo; PI: plasma

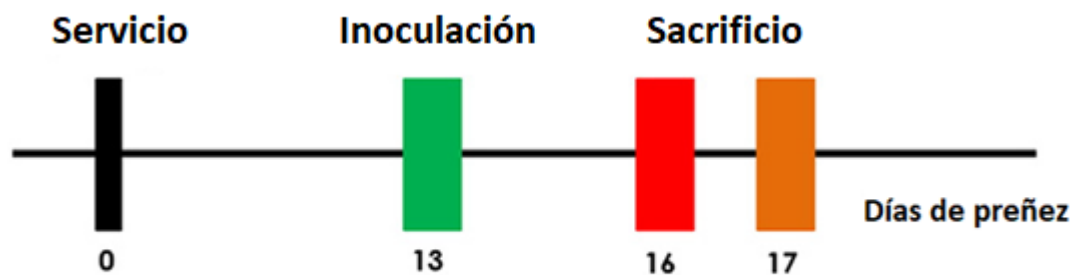
Con los resultados obtenidos en esta etapa se definió continuar los estudios al día 3 y 4 pi.

ETAPA 2

Determinación de cambios a nivel de la respuesta inmune innata y adaptativa que intervengan en la interrupción de la gestación por EHV-1

Inoculación experimental

Las ratonas positivas al diagnóstico de gestación se controlaron diariamente para registrar los cambios en su peso y estado general. Al día 13 de preñez se pesaron e infectaron según lo descrito en las experiencias de la Etapa 1. Luego de la infección se realizó un seguimiento diario de la evolución de su estado general y para detectar la aparición de signos clínicos. Al día 3 y 4 pi fueron levemente anestesiadas con isoflurano y luego del sangrado a blanco ([Eöry y col., 2013](#)) se realizó la necropsia y la toma de muestras (**ver Diseño experimental**).



Diseño experimental

En total se analizaron 12 hembras preñadas. Seis de ellas fueron sometidas a eutanasia al día 3 pi y constituyeron el Grupo ID3, mientras que otras 6 al

día 4 pi, conformando el Grupo ID4. Los controles negativos inoculados con MEM-M constituyeron los Grupos CD3 (n= 4) y CD4 (n=4), respectivamente.

Evaluación clínica, necropsia y toma de muestra

Los animales fueron observados diariamente para la determinación de signos clínicos característicos de la infección, y finalmente sacrificados según el esquema propuesto. En la necropsia de 4 hembras del Grupo ID3 y del Grupo ID4 y de 2 controles de CD3 y CD4 se tomaron muestras de pulmón y cuerno derecho de útero con sus UFP. Estas muestras se conservaron a -70°C para confirmar la infección mediante el AV y PCR, y para la determinación de citoquinas por ELISA o Citometría de flujo (CF). Se extrajeron los cuernos uterinos izquierdos con las UFP y se colocaron las placentas y el útero en N₂ líquido durante 30 min, para posteriormente pasarlas a -70°C hasta que fueron procesadas para determinación de ARNm por PCR en tiempo real (qPCR). Los fetos fueron almacenados de la misma manera que los del lado derecho.

Dos hembras del grupo ID3, dos del ID4, dos del CD3 y dos del CD4 fueron destinadas para los estudios histopatológicos. Para ello, luego de anestesiarlas con isoflurano fueron perfundidas con paraformaldehído para obtener una mejor conservación de la estructura histológica de los tejidos.

Aislamiento viral y PCR

La metodología de AV y PCR fue descrita en las experiencias de la Etapa 1.

Estudios moleculares. Determinación de citoquinas

PCR en tiempo real

- Extracción de ARN:

Las muestras de útero y placentas fueron disgregadas y homogeneizadas, manteniéndose durante todo su procesamiento en bloque frío (4°C). Posteriormente se realizó la extracción de ARN a partir de aproximadamente 100 mg de tejido homogeneizado utilizando 1 ml de TRIzol (Invitrogen) y cloroformo, se realizó la precipitación con isopropanol y lavados con etanol 70° (**Anexo 1**). Para eliminar el ADN genómico contaminante las muestras se trataron con ADNasa (Promega) a baño María durante 30 min a 37°C, y se finalizó la reacción con solución de *stop* durante 10 min a 65°C.

- Retrotranscripción:

Inmediatamente se procedió a la síntesis de ADNc con M-MLV (Promega) de acuerdo con el protocolo del fabricante y posteriormente se conservaron a -20°C (**Anexo 2**).

- *Primers*:

La cuantificación del ARNm de cada citoquina se realizó por PCR en tiempo real (qPCR) utilizando *primers* específicos (método estandarizado a partir de

Woudwyk y col., 2012) (**Tabla 3**). Para la validación de los *primers* se pusieron a punto los parámetros mediante la técnica de PCR, tomando en cuenta la temperatura de *melting* proporcionada por el proveedor de los mismos y el tamaño del amplicón producido. Durante el proceso de validación, los productos de PCR fueron sembrados en un gel de agarosa al 2,5% con el fin de corroborar la amplificación específica del producto en cuestión y la ausencia de dímeros de *primers*.

Tabla 3. Secuencia de *primers* específicos utilizados en la qPCR para la determinación de ARNm de cada citoquina.

IFN- γ	F: TCAAGTGGCATAGATGTGGAAGAA R: TGGCTCTGCAGGATTTTCATG
TNF- α	F: TCG AGT GAC AAG CCC GTA GC R: CTC AGC CAC TCC AGC TGC TC
IL-4	F: GTG ATG TGG ACT TGG ACT CAT TCA R: CTC ATG GAG CTG CAG AGA CTC TTT
IL-10	F: CCT GCT CCA CTG CCT TGC T R: GAA GAC CCT CAG GAT GCG G
Foxp3	F: TTC TCA CAA CCA GGC CAC TTG R: CCC AGG AAA GAC AGC AAC CTT
β -actina	F: GCT TCT TTG CAG CTC CTT CGT T R: GTT GTC GAC GAC CAG CGC

- **Amplificación:**

La amplificación se realizó en un iCycler (Bio-Rad, USA). Las reacciones se llevaron a cabo utilizando Mezcla Real (Biodynamics SRL), *primers*, moldes y agua libre de nucleasas, en un volumen final de 25 µl y por duplicado (**Anexo 3**). Una vez establecidos los parámetros de amplificación de cada par de *primers*, se determinó la eficiencia de amplificación por qPCR mediante la ecuación: $E = 10^{-1/\text{slope}}$ (Pfaffl, 2001; Pfaffl y col., 2002).

- **Análisis estadístico:**

La expresión génica se determinó mediante un método de cuantificación relativa expresada como $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak y Schmittgen, 2001). Todas las muestras fueron normalizadas en relación con su contenido de β -actina (gen de *housekeeping*).

Citometría de flujo

Las muestras (media placenta y el cuerno uterino izquierdo), se homogeneizaron con micropistilos, se diluyeron con PBS estéril (aproximadamente 500 µl), y se centrifugaron a 4000g durante 4 minutos a 4 °C. Luego al sobrenadante, se le adicionó inhibidor de proteasas (~45 µl), se centrifugó y se midió la concentración de proteínas en un fluorómetro (Qubit 2.0. LifeTechnology).

Posteriormente el procesamiento se continuó con un *kit* comercial (CBA TH1-TH2-TH17 system -BD Biosciences-) siguiendo las instrucciones

del fabricante. Las mediciones se realizaron en un Citómetro FACSCalibur gentilmente ofrecido por la Dra Cecilia Muglia del Instituto de Estudios Inmunológicos y Fisiopatológicos (Facultad Ciencias Exactas, UNLP-CONICET).

ELISA

Parte de las muestras de útero y placenta tratados con inhibidor de proteasa (utilizadas para CF) y los sueros de todos los grupos experimentales también fueron analizados por ELISA sandwich para determinar IL-12 según el protocolo provisto en la sección protocolo de Becton Dickinson Biosciences.

En una primer instancia se evaluaron distintas concentraciones del Ac de captura anti IL-12 (Purified Rat Anti-Mouse IL-12 p40/p70. BD Pharmingen) (1-4 µg/ml), y se colocaron 100 µl/pocillo en una placa de ELISA (maxisorp-NUNC) que fueron incubadas toda la noche a 4°C.

Posteriormente se descartó el Ac y se realizó el bloqueo, colocando 200 µl/pocillo de la solución de bloqueo y se incubó a ta durante 1 h. Se realizaron tres lavados con solución de lavado (**Anexo 4**). Se prepararon las diluciones del estándar de IL-12 (Recombinant Mouse IL-12 p40 BD Pharmingen) en solución de bloqueo de manera de obtener una curva con concentraciones desde 4000 pg/ml a 62,5 pg/ml como sugiere el fabricante. Para ello se colocaron 200 µl en la primer columna y se realizaron diluciones seriadas. Además se determinó la dilución de uso del Ac biotinilado (Biotin

Rat Anti-Mouse IL-12 p40/p70. BD Pharmingen), analizando concentraciones de 0,5 a 2 µg/ml. Se colocaron 100 µl/pocillo de la dilución correspondiente, se incubó 1 h a ta y se lavó 4 veces. Se diluyó la Av-HRP (Avidin-Horseradish Peroxidase) en solución de bloqueo, y se agregaron 100 µl/pocillo. A continuación se incubó la placa por 30 min a ta, se la lavó nuevamente y se agregó la solución de sustrato. Finalmente, se adicionaron 100 µl/pocillo y se incubó 1 h hasta realizar la lectura a los 60 min utilizando un filtro de 405 nm en un lector para microplacas (Thermo Scientific Multiskan FC).

Una vez determinadas las concentraciones de los Ac a utilizar se analizaron las muestras; para el caso del Ac de captura, la concentración de uso fue 1 ug/ml, y para el Ac de detección 0,5 ug/ml. Luego de realizar el bloqueo, se sembraron las muestras puras, colocando 100 µl/pocillo, en paralelo con la curva del estándar. Las placas se incubaron 2 h a ta, y se siguió el protocolo como se mencionó anteriormente.

Estudios histológicos y de inmuno y lectinohistoquímica.

La metodología fue descripta en las experiencias de la Etapa 1.

Identificación de células uNK

Para la identificación de las células uNK en las placentas se utilizó la técnica histoquímica de PAS. Para el empleo de esta técnica se usó una solución de HIO₄ al 1% y el reactivo de Schiff. Este último se preparó

utilizando 200 ml de agua destilada en ebullición a la que se le agregó 1 g de fucsina básica. Cuando la solución alcanzó los 50°C se colocaron 2 g de $K_2S_2O_5$, se dejó enfriar hasta ta y luego se acidificó con 2 ml de ácido clorhídrico. Posteriormente, se adicionaron 2 g de carbón activado, y se conservó la solución hasta el día siguiente en la oscuridad, a ta. Luego de filtrada, la solución resultó clara o con una coloración amarillo pálida (Martoja y Martoja, 1970; Cook, 1990)

Los cortes fueron desparafinados e hidratados como fuera descripto previamente, y se trataron con el HIO_4 al 1% durante 15 minutos. Se lavó con agua destilada y luego se colocó el reactivo de Schiff durante 5 a 10 minutos. Cuando alcanzaron el color deseado se lavó con agua corriente durante 10 min y luego con agua destilada. Los cortes fueron deshidratados, aclarados y montados. Las sustancias PAS positivas se observaron de color rosa fucsia.

Determinación de cambios en la proliferación y muerte celular por IHQ

Para estudiar cambios en la proliferación celular de las placentas se aplicó la técnica de IHQ utilizando Ac anti-PCNA (anti PCNA, monoclonal producido en ratón, clone PC 10, fluido ascítico, Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo, EE.UU), diluido 1/3000, previamente tratado con Dako ARK (*Animal Research Kit*) Peroxidase System para reducir la posible reactividad del sistema de detección con inmunoglobulinas endógenas. Los sitios no específicos fueron bloqueados con un *kit* comercial (Biogenex, Fremont, CA). El Ac primario fue reemplazado por suero normal de ratón para obtener

muestras de control negativo de la reacción. La DAB fue usada como cromógeno y la hematoxilina como coloración de contraste.

El Ac anti-*PCNA* permite reconocer las células que se encuentran durante la fase “S” del ciclo celular, debido a que *PCNA* (*proliferating cellular nuclear antigen*), también llamada “abrazadera deslizante”, es una proteína que mantiene firmemente unida a la ADN polimerasa a la hebra de ADN mientras se está realizando la replicación.

La determinación de cambios en la muerte celular se realizó utilizando la técnica de TUNEL, utilizando el *TUNEL In situ cell death detection*, TMR rojo (Roche), para inmunofluorescencia, siguiendo las instrucciones del fabricante. Durante la apoptosis el ADN se fragmenta generando la formación de numerosos fragmentos con los extremos 3' hidroxilos libres. Con esta técnica se ponen de manifiesto esos extremos libres mediante el agregado de nucleótidos (desoxiuridina trifosfato, *dUTP*) marcados por la acción de la enzima desoxi transferasa terminal (*TdT*).

Para esta técnica los cortes fueron desparafinados, deshidratados e incubados con proteinasa K durante 20 min a ta. Después de dos lavados con PBS que contenía *Tween20* al 0,5% (Merck, Schuchardt OHG, Hohenbrunn, Alemania) los cortes se incubaron con la mezcla de reacción que contiene nucleótidos modificados (TMR-dUTP) y la enzima terminal de desoxinucleotidiltransferasa (*TdT*) que cataliza la polimerización independiente de los desoxirribonucleótidos al extremo 3' del DNA monocatenario y bicatenario. Después de dos lavados de 5 min cada uno,

los núcleos fueron teñidos con 5 µg/ml de DAPI (6-diamidino-2-Fenilindolo - Invitrogen Life Technologies, Eugene, Oregon, EE.UU).

Finalmente, se realizaron dos lavados con PBS y los cortes se montaron con medio de montaje acuoso (Reactivo FluoroSave™ (Calbiochem, La Jolla, CA, EE.UU.) y luego se examinaron bajo microscopía confocal. Como control negativo se utilizó la solución diluyente (*label solution*) sin los nucleótidos modificados (TMR-dUTP) ni la enzima terminal.

Lectinohistoquímica

Teniendo en cuenta los cambios vasculares descritos en las placentas infectadas por el EHV-1 se utilizó la técnica de lectinohistoquímica (LHQ) para evaluar morfológicamente alteraciones vasculares en las placentas de las ratonas infectadas. Para ello, se utilizó la lectina BSA-1 (*Bandeiraea simplicifolia/Griffonia simplicifolia*, con afinidad por residuos terminales de α-D-galactosa y N-acetil-α-D-galactosamina), utilizada como un marcador del endotelio capilar fetal del laberinto placentario durante la gestación media-tardía. Esta lectina distingue la capa de células endoteliales de los capilares fetales de los espacios sanguíneos maternos (en los que no existe capa de células endoteliales) ([Charalambous y col., 2013](#); [Motta y col., 2015](#)). El patrón de distribución de su marcación fue comparado entre las placentas de las hembras controles y las infectadas. Para ello el material cortado fue desparafinado en xileno y rehidratado con alcoholes de manera decreciente. Se bloqueó la actividad de peroxidasa endógena usando H₂O₂.

Para aumentar la exposición de residuos de carbohidratos se utilizaron 800 W de irradiación de microondas dos veces durante 3 min en *buffer* citrato PH 6,0. La incubación con BSA-1 se realizó a 37°C durante 1 h y luego se incubó con estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano picante (estreptavidinaSA – 5704, Laboratorio Vector, Inc., Burlingame CA, EE.UU.) 30 min a ta. Los cortes se lavaron tres veces en PBS, 5 min cada vez, el revelado se realizó con DAB y como coloración de contraste se usó hematoxilina.

Análisis morfométrico

La realización del estudio morfométrico consistió en los siguientes pasos: a) captura de las imágenes y almacenamiento en soportes electrónicos, b) procesamiento de las imágenes, c) segmentación de los objetos seleccionados y enmascaramiento del resto de los objetos de la imagen, d) análisis de las formas, e) presentación gráfica y estadística. Las imágenes se capturaron con un microscopio trinocular (Olympus BX50, Tokyo, Japan10, 20 o 40 X, y con una cámara de video digital (Olympus DP71, Tokio, Japón) montada sobre el microscopio conectada con una computadora de alto rendimiento (Intel Core i7). Las imágenes fueron digitalizadas y almacenadas en formato TIF de 24 bits, RGB, para conservar todos los detalles observados al microscopio, y luego fueron analizadas con un programa de análisis de imágenes computarizado (*Image Pro Plus* v6.3, *Media Cybernetics*, Bethesda, MD).

Cuantificación de proliferación y muerte

La cuantificación consistió en el recuento de los núcleos positivos para PCNA y TUNEL en 10 imágenes de cada placenta obtenidas a 20x. Se determinó el porcentaje de núcleos positivos sobre el total de ellos.

Cuantificación de la marca de BSA-1

Para discriminar la señal cromogénica de BSA-I del resto del tejido se procedió a realizar la segmentación de la imagen y se determinó la relación entre el área marcada y el resto del tejido (área marcada de BSA-1/área total de tejido).

Análisis estadístico

Para determinar las diferencias entre el grupo infectado y el grupo control, se utilizó la prueba t de *Student*. Los resultados se muestran como media \pm desviación estándar (SD). La significancia se asumió con valores de $p < 0,05$.

RESULTADOS ETAPA 2

Observación de signos clínicos y anatomopatológicos

Los animales infectados experimentalmente comenzaron a presentar depresión general, pelo hirsuto a partir de las 12 h pi, y signos respiratorios leves en los dos primeros días pi. A la necropsia, cuatro de las seis hembras infectadas mostraron menor número de fetos con respecto a las hembras no infectadas aunque el análisis no fue estadísticamente significativo (**Figura 25**).

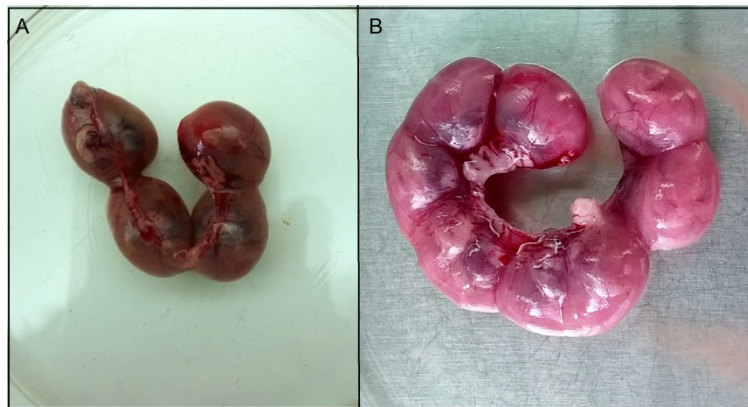


Figura 25. Útero de hembras BALB/c gestantes. Se observa un menor número de UFP en el grupo infectado (**A**) con respecto al grupo control (**B**).

Detección de EHV-1 por aislamiento viral y PCR

El AV y la PCR fueron positivos a partir de las muestras de pulmón de las ratonas infectadas y sacrificadas a los días 3 y 4 pi.

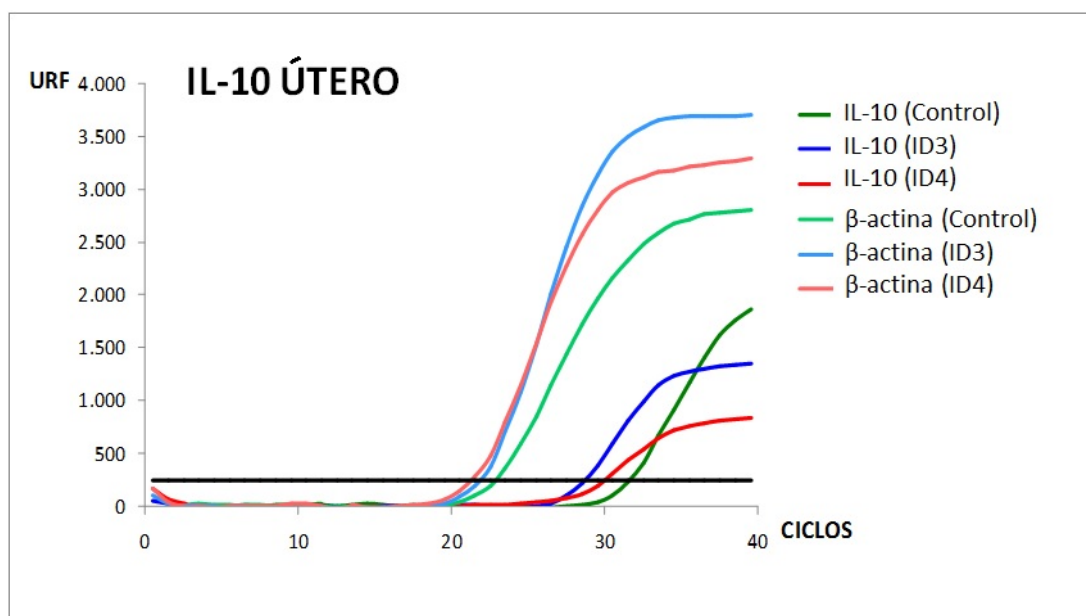
Determinación de citoquinas

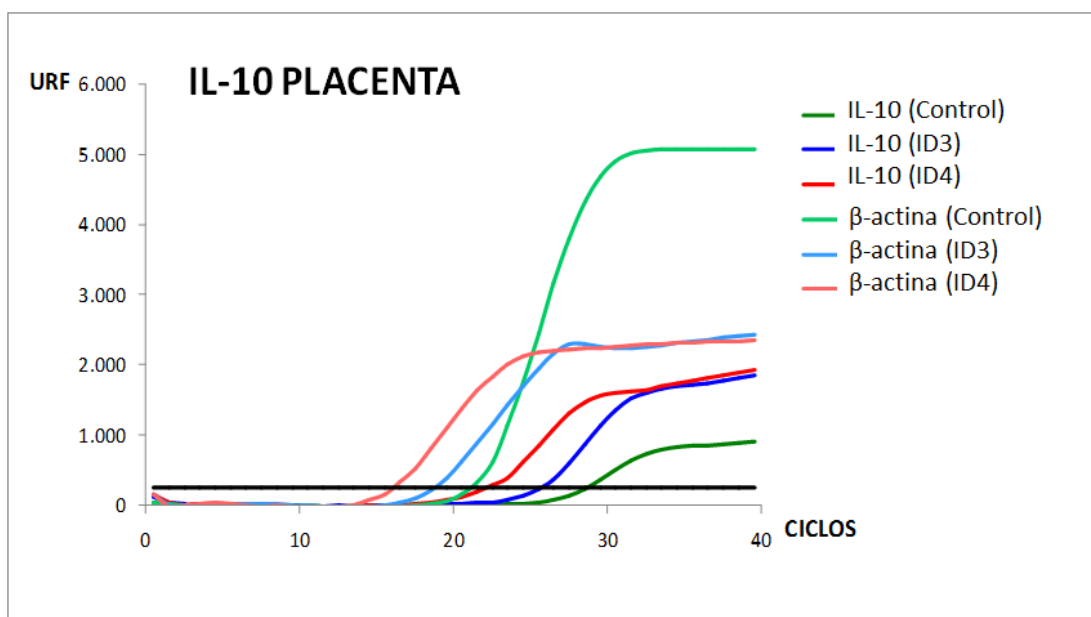
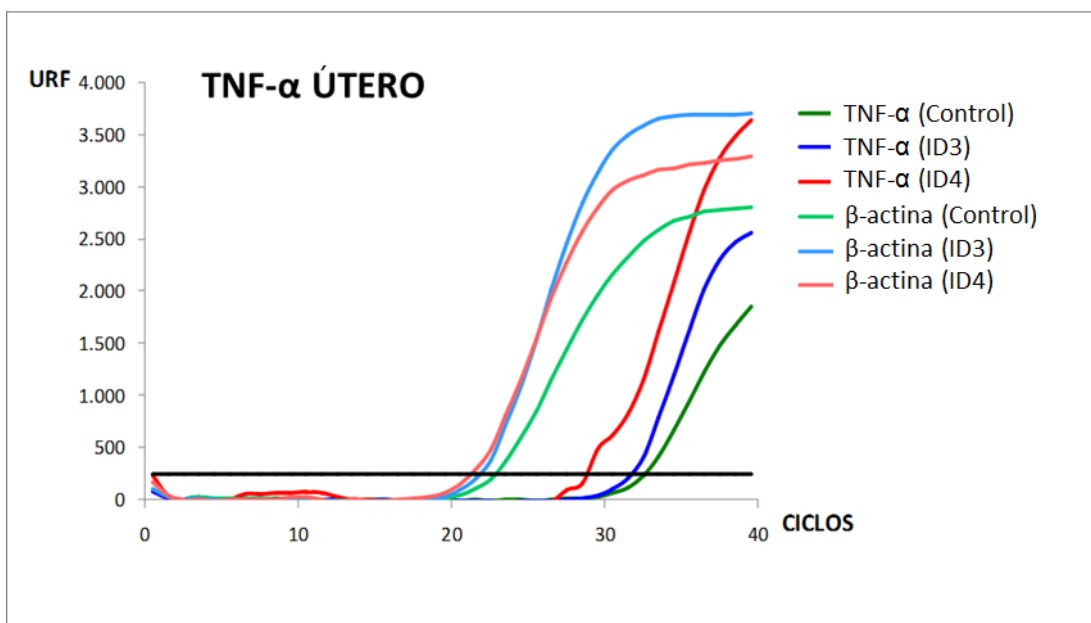
PCR en tiempo real

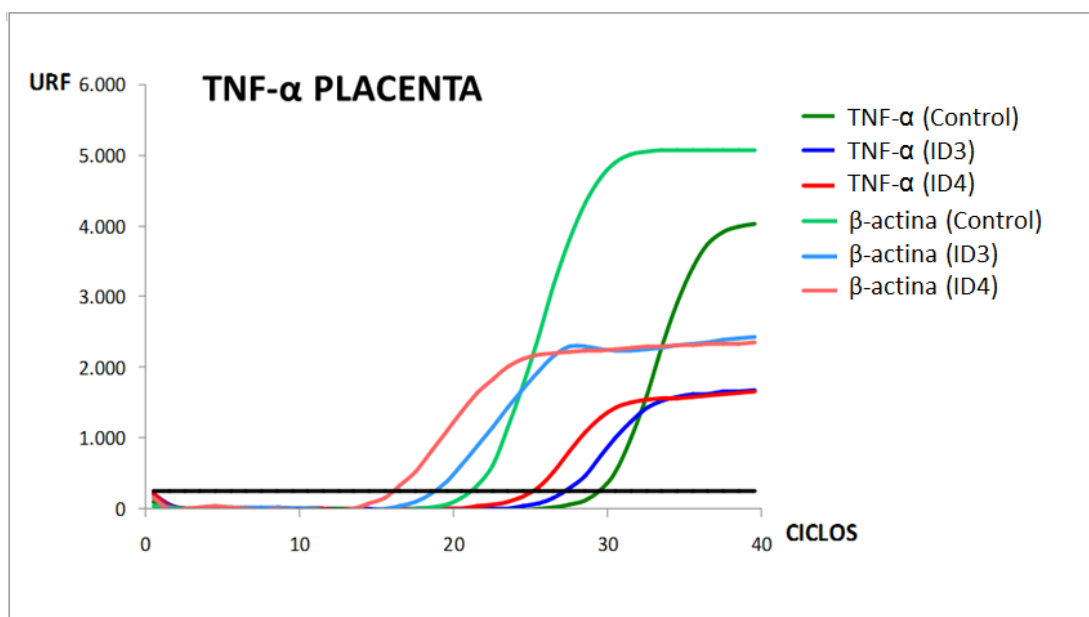
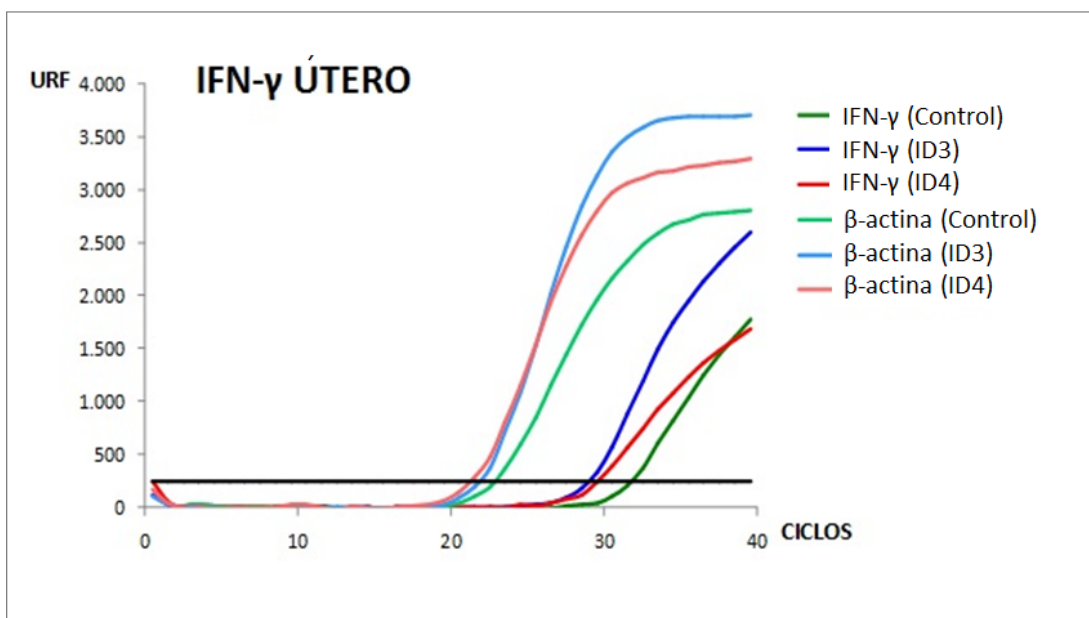
El protocolo de amplificación consistió en: 95°C durante 10 minutos (desnaturalización inicial), y 40 ciclos de: 60°C 1 min, 72°C 30 segundos y 95°C 15 segundos, con una extensión final de 72°C por 2 minutos.

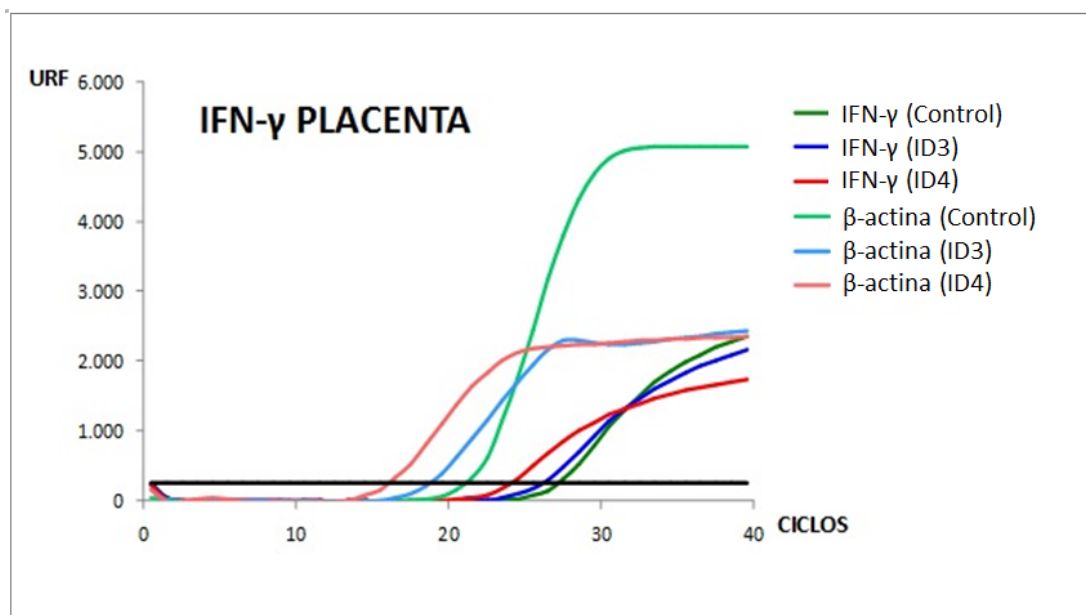
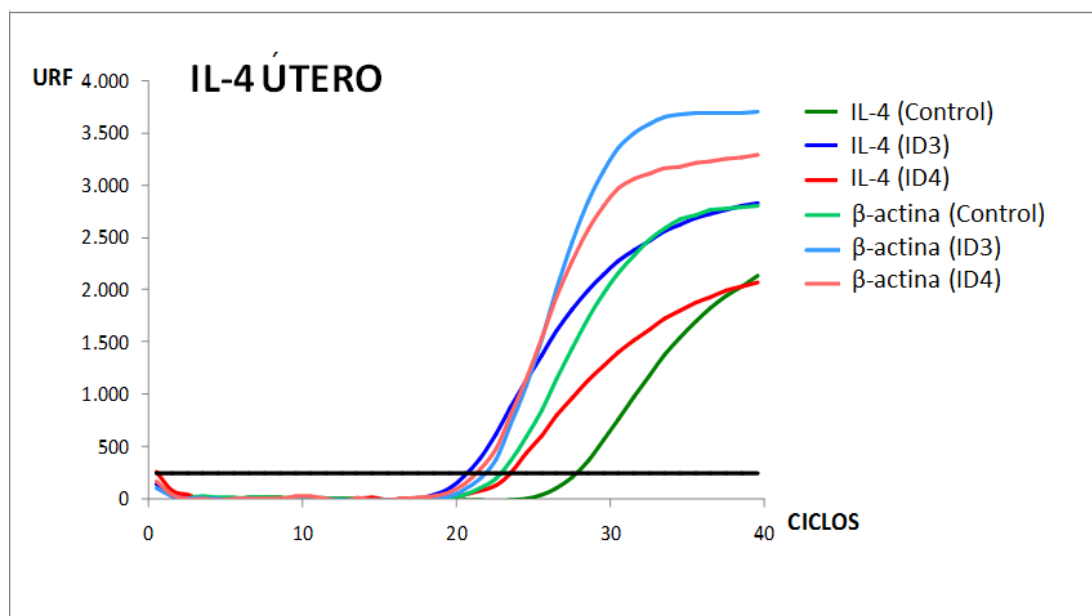
En las **figuras 26** se muestra las curvas de amplificación para cada *primer* en útero y placenta.

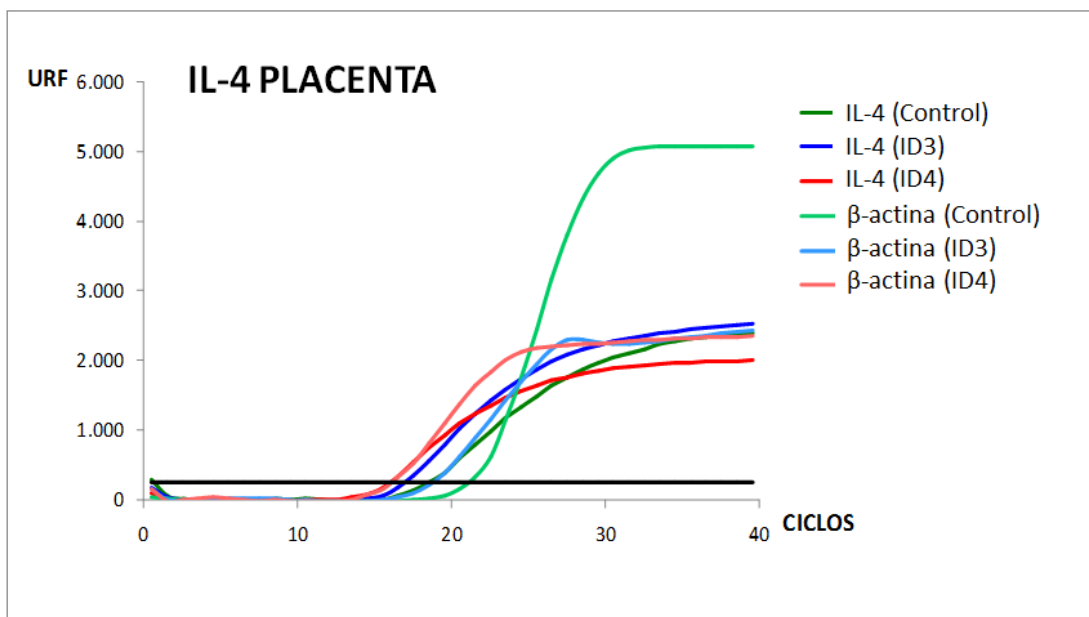
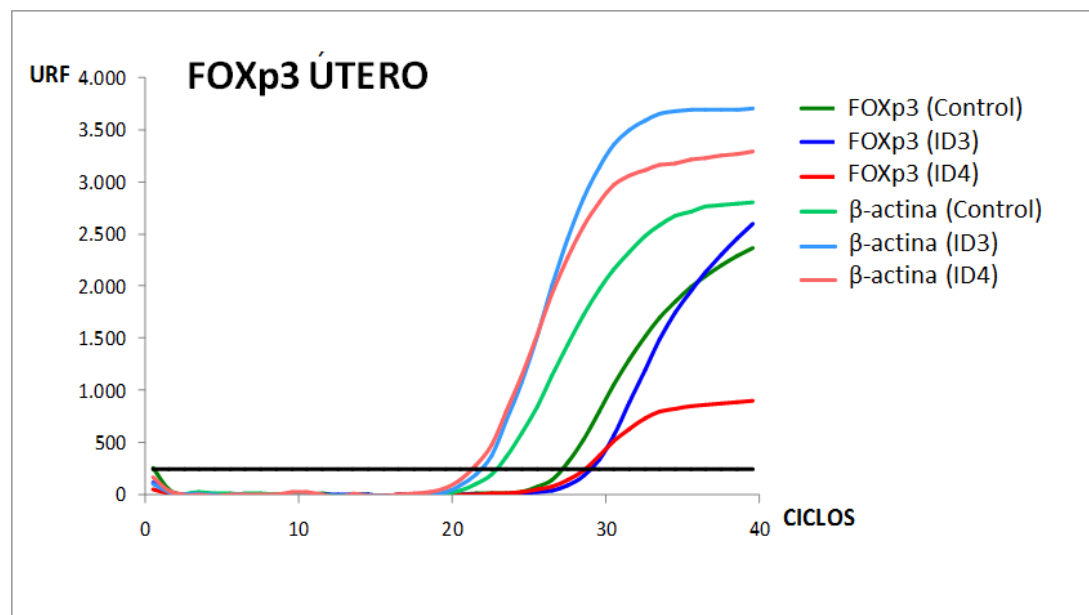
A



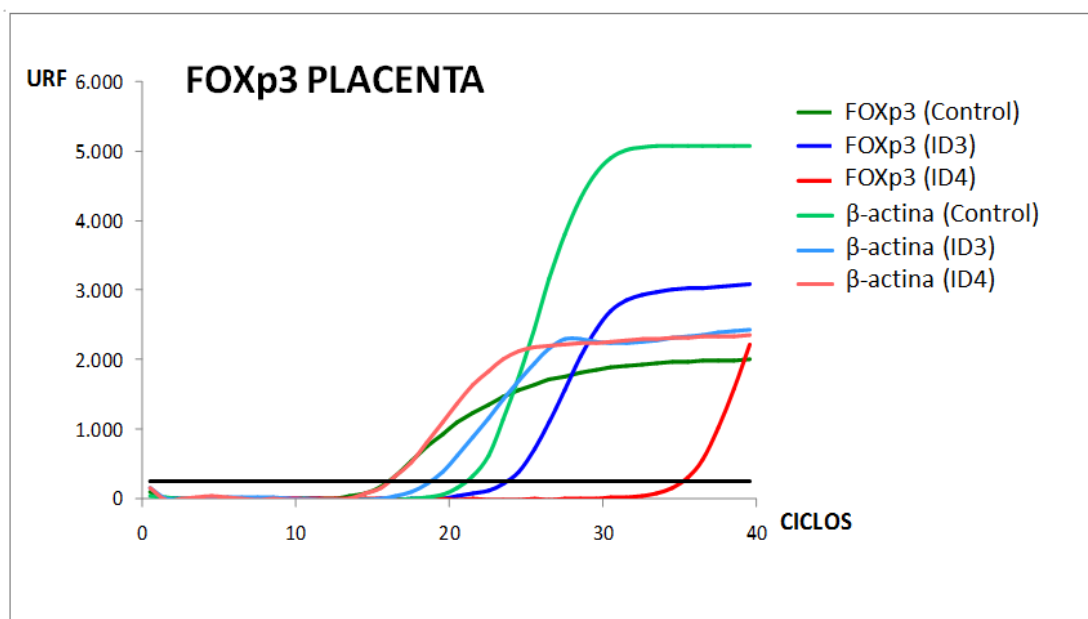
B**C**

D**E**

F**G**

H**I**

J



Figuras 26. Curvas de amplificación de qPCR obtenidas para cada par de primers en útero y placenta de ratonas BALB/c preñadas. **A:** IL-10 en útero; **B:** IL-10 en placenta; **C:** TNF- α en útero; **D:** TNF- α en placenta; **E:** IFN- γ en útero; **F:** IFN- γ en placenta; **G:** IL-4 en útero; **H:** IL-4 en placenta; **I:** Foxp3 en útero; **J:** Foxp3 en placenta. Control: grupo control sin infectar; ID3: grupo infectado sometido a eutanasia al día 3 posinfección; ID4: grupo infectado sometido a eutanasia al día 4 posinfección.

- La cuantificación relativa de las citoquinas estudiadas por qPCR mostró un aumento significativo en el ARNm de **IL-10** en las placentas de ambos grupos de ratonas infectadas, y en el útero del grupo ID3.
- El ARNm de **TNF- α** disminuyó significativamente en las placentas de los ratones ID3, mientras que hubo un aumento en el útero del grupo ID4.
- El ARNm de **IFN- γ** disminuyó significativamente en las placentas de ambos grupos infectados, pero aumentó en el útero (**Figura 27**).

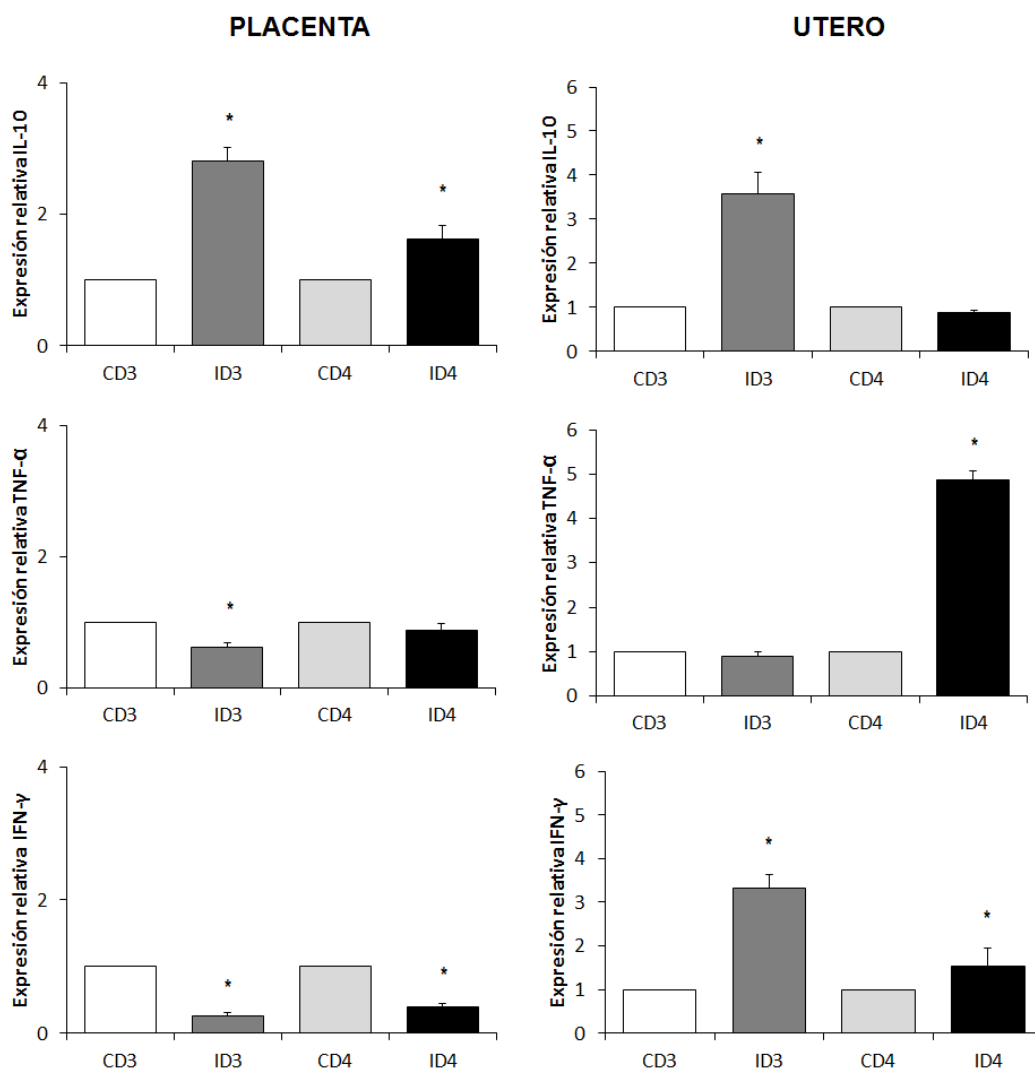


Figura 27. Determinación de transcritos de TNF- α , IFN- γ e IL-10 por qRT-PCR en placentas y úteros de ratonas control e infectadas. (*) Diferencias significativas con respecto al grupo control. $p \leq 0,05$.

- La expresión del ARNm de **IL-4** se encontró especialmente disminuida en el útero y las placentas de las ratonas infectadas, tanto para el día

3 como para el día 4 pi, con respecto al grupo control. Además se determinó que **FOXP3** disminuyó también en el útero y placenta de los animales infectados de ambos grupos (**Figura 28**).

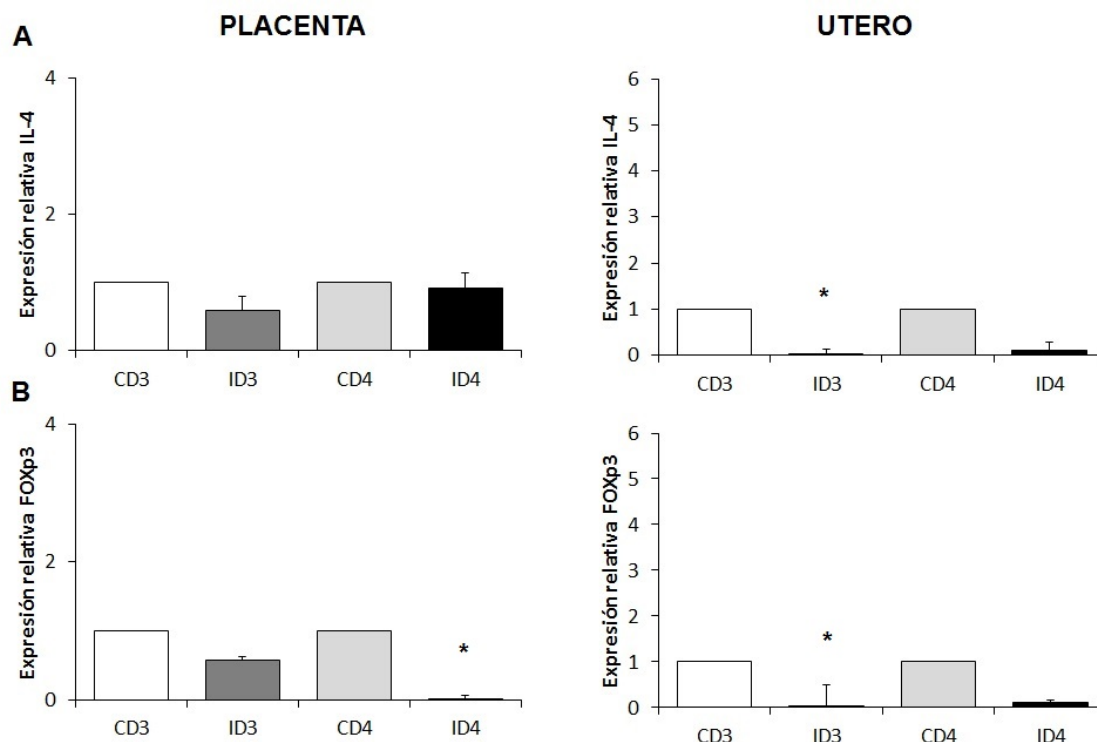


Figura 28. Determinación de transcritos de FOXP3 e IL-4 qRT-PCR en placentas y úteros de ratonas control e infectadas. (*) Diferencias significativas con respecto al grupo control. $p \leq 0,05$.

Citometría de flujo

TNF- α se incrementó significativamente al día 3 pi en las placentas y el útero con respecto al grupo control. No se hallaron diferencias significativas para IFN- γ ni para IL-10 (**Figura 29**).

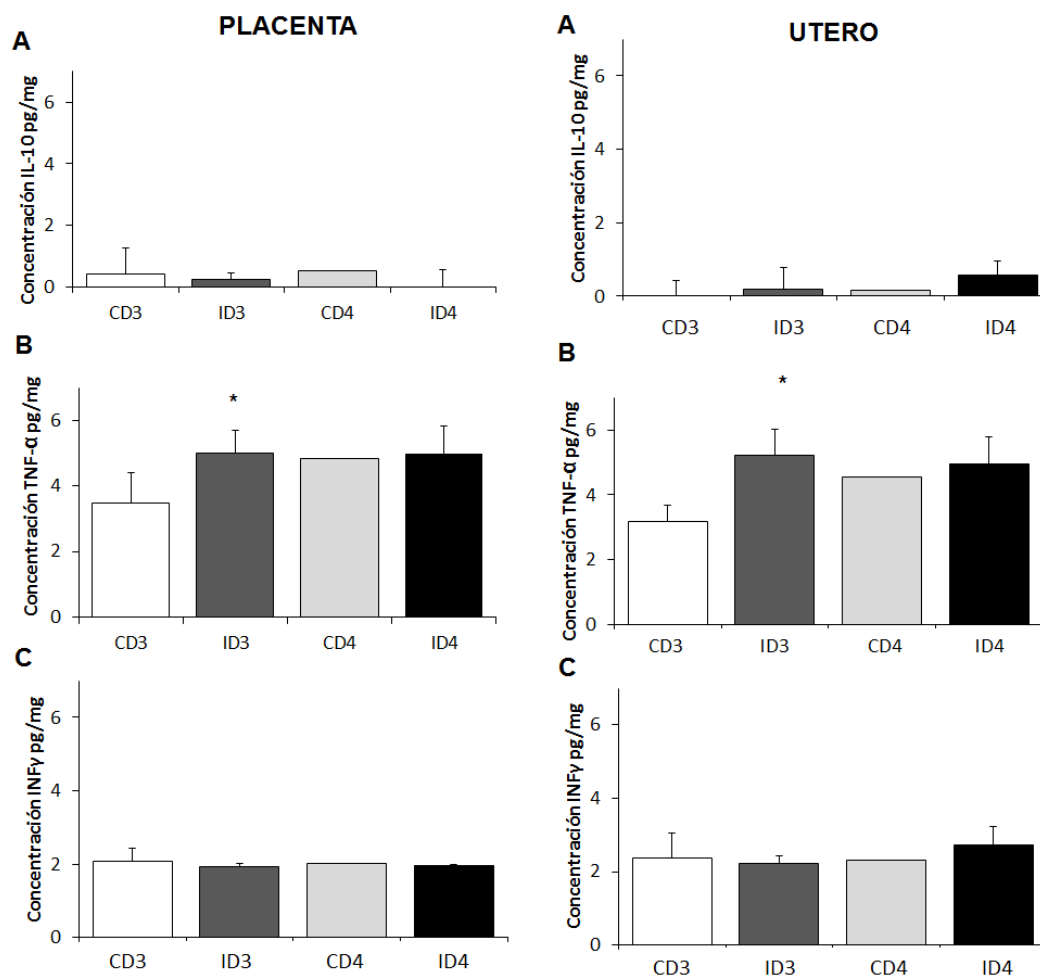


Figura 29. Citometría de flujo. Detección de IL-10 (A), TNF-α (B) e IFN-γ (C) en placentas y útero de ratonas control e infectadas. (*) Diferencias significativas con respecto al grupo control. $p \leq 0,05$.

ELISA

Los resultados de DO a 405 nm obtenidos para IL-12 de los sueros del grupo infectado y control, que fueron analizados mediante el empleo de un

test de Student, para comparar las medias de ambos grupos al tratarse de una "n" menor a 30, demostró diferencias significativas ($p < 0,001$). En la **figura 30** se representan los resultados obtenidos, y se puede observar la diferencia del grupo control con respecto al grupo infectado. En el caso de las muestras de útero y placenta no se encontraron diferencias significativas.

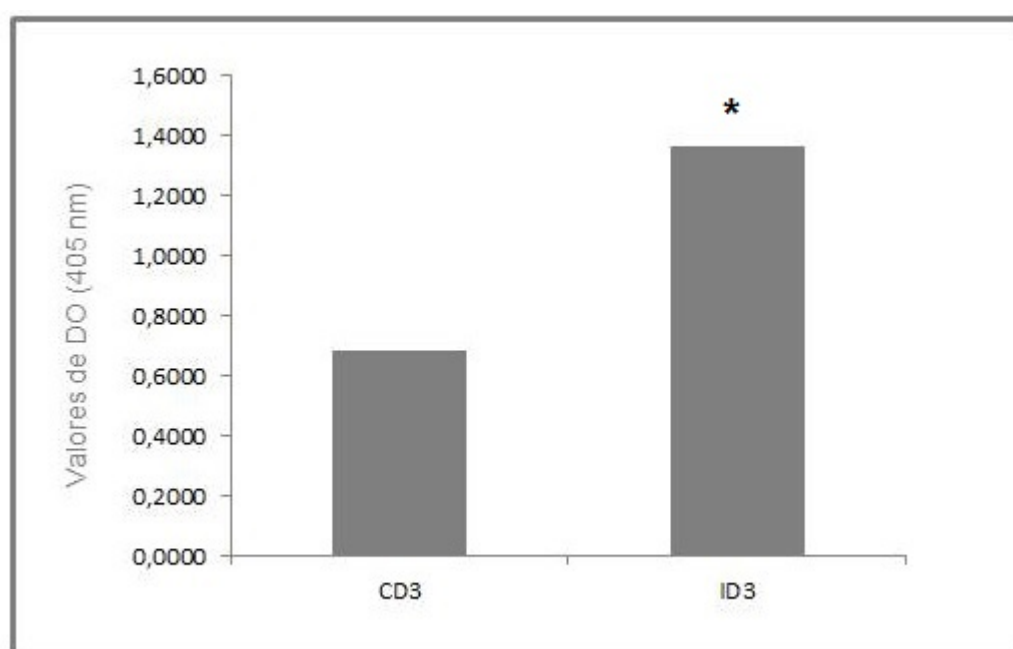


Figura 30. Técnica de ELISA sándwich para detección de IL-12 en sueros de ratonas control (CD3) e infectadas (ID3). (*) Diferencias significativas con respecto al grupo control ($p < 0,001$).

Detección de EHV-1 por inmunohistoquímica

En todos los grupos infectados se detectaron células epiteliales bronquiales y bronquiolares positivas al virus (**Figura 31 B**). En los

pulmones, úteros y UFP de los animales del grupo control no se detectaron antígenos virales.

Hallazgos histológicos

Los pulmones y las placentas de las ratonas controles (inoculadas con MEM-M) presentaron características histológicas normales, sin signos de infección viral ni de inflamación.

Por otra parte, en los pulmones de todos los grupos infectados con EHV-1 se observaron cambios histopatológicos característicos de la infección con este virus. Se detectaron focos de infección localizados principalmente en el epitelio de los bronquiolos distales y de los bronquiolos respiratorios, acompañado por un infiltrado inflamatorio mononuclear. En algunos sectores de los epitelios se observaron escasos sincicios, zonas de erosión y cuerpos de inclusión intranucleares eosinófilos (**Figura 31 A**).

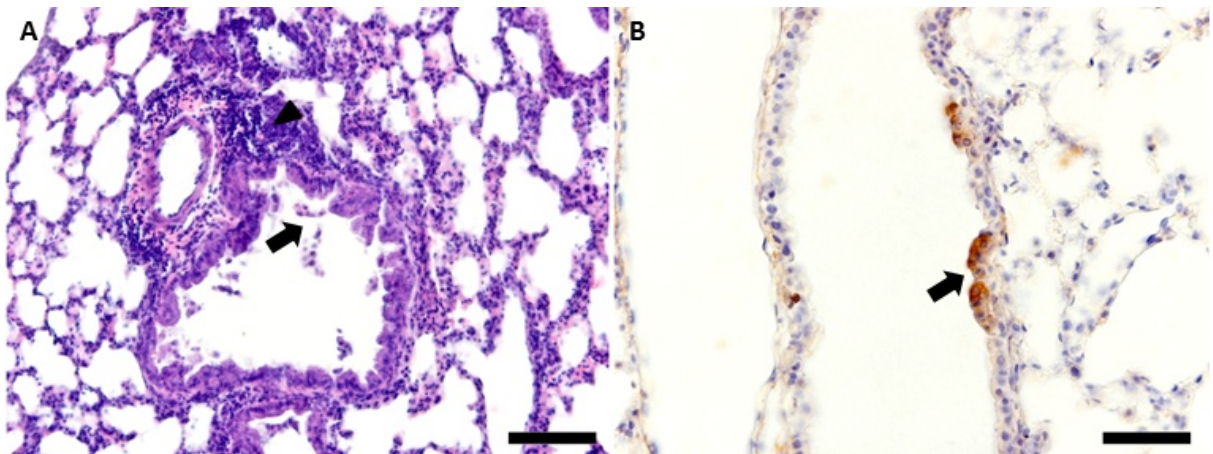


Figura 31 **A.** Pulmones de animales inoculados con la cepa AR8 y aislados el día 3 pi. La flecha indica el desprendimiento del epitelio bronquiolar y la punta de flecha señala una infiltración mononuclear moderada alrededor de las vías respiratorias y de los vasos sanguíneos, cambios indicativos de infección. HE. Barra = 100 μ m. **B.** IHQ anti EHV-1 en pulmón: Marcación positiva en células epiteliales bronquiolares (flecha). Barra = 50 μ m.

Las placentas de las ratonas infectadas presentaron congestión vascular general en el laberinto y ocasionales trombos en pequeños vasos de las capas de espongiotrofoblasto y decidua (**Figura 32**). Además, en algunas placentas de ambos grupos infectados (día 3 y 4 pi) se encontró una reducción de la zona de espongiotrofoblasto con un tramo de necrosis y un gran número de células *uNK*, identificadas con la técnica histoquímica de PAS.

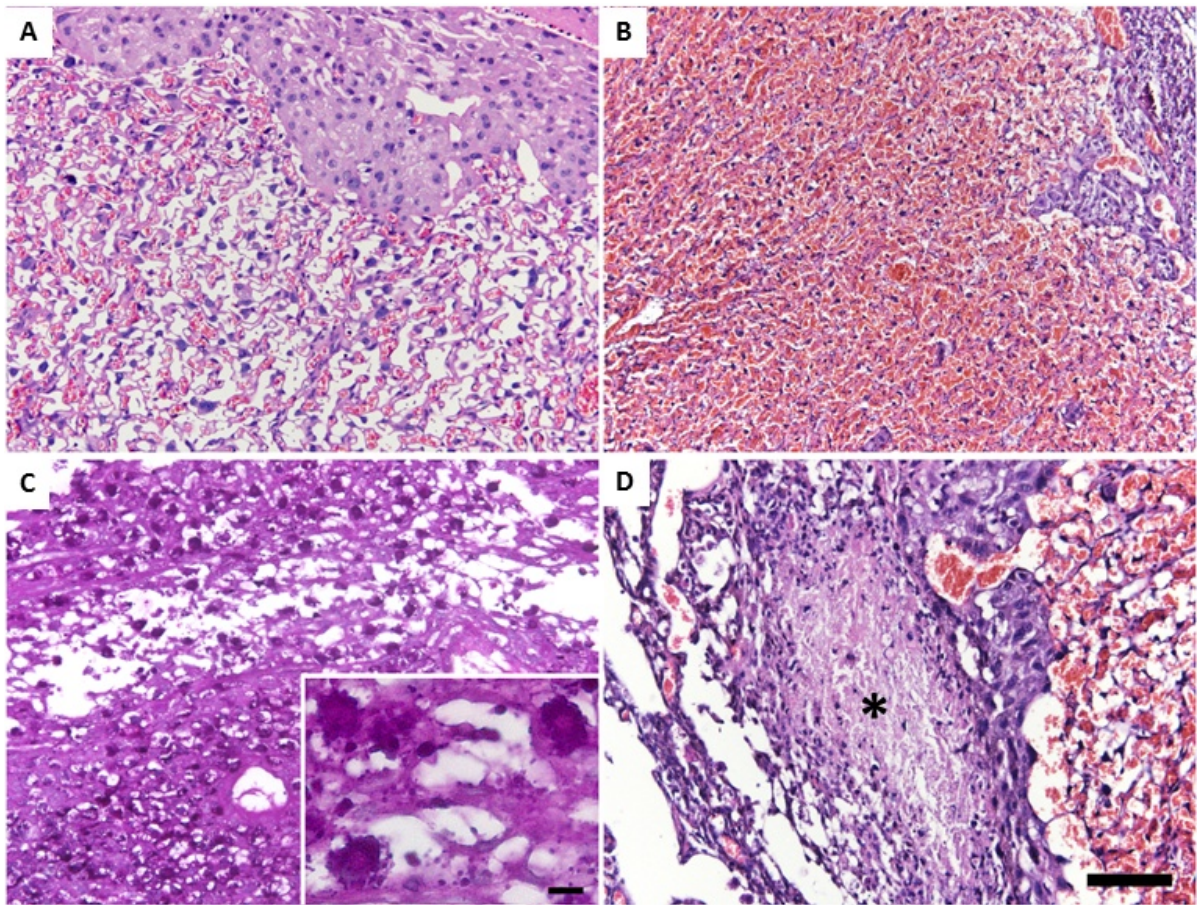


Figura 32. Placenta. HE. **A.** Control de la placenta. **B.** Placenta de ratona infectada al día 4 pi con congestión vascular en la zona del laberinto. **C.** Células *uNK* en el espongiotrofoblasto y en la decidua de ratonas infectadas. Recuadro: detalle de células *uNK* PAS positivas. Barra= 10µm. Técnica de PAS (flechas). **D.** Zonas necróticas en la zona de espongiotrofoblasto (*). HE. Barra = 100 µm.

Morfometría

Área de espongiotrofoblasto y laberinto: se observó un aumento en el área del laberinto de ambos grupos infectados que sólo fue significativa en las ratonas del grupo ID3. El área del espongiotrofoblasto se redujo significativamente al día 3 pi, mientras que al día 4 pi se incrementó significativamente (**Figura 33**).

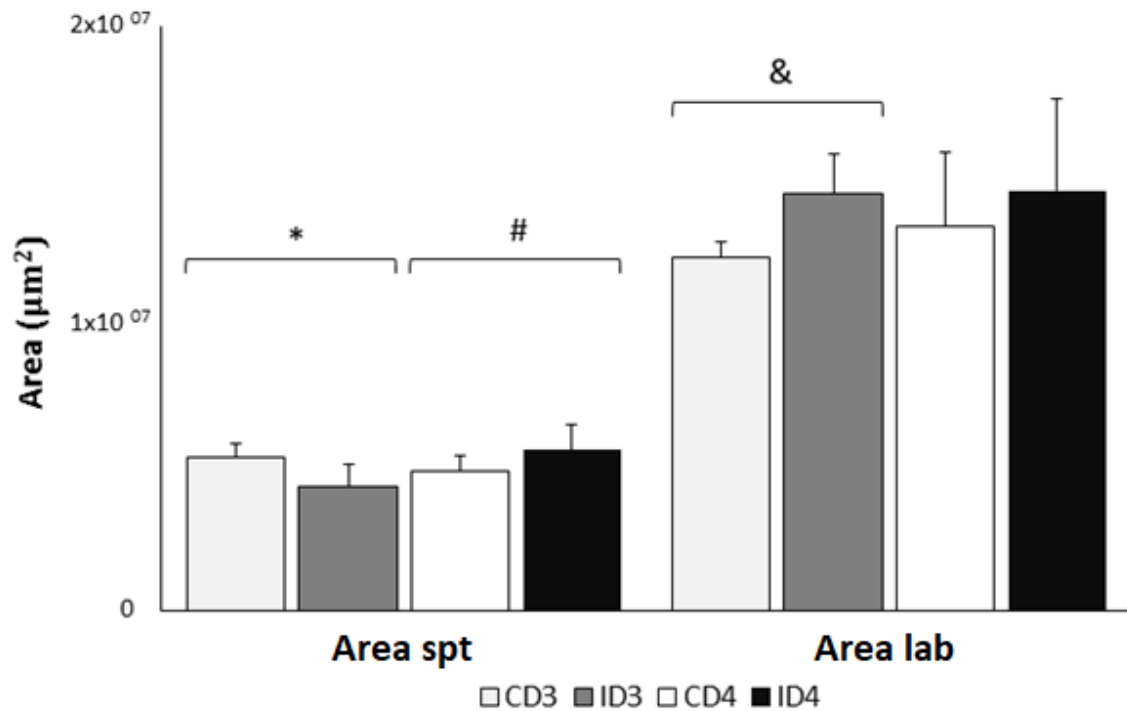


Figura 33. Morfometría de las áreas de espongiotrofoblasto y laberinto. Se observa un aumento significativo del área laberíntica en las placentas de las ratonas (&), $p \leq 0,05$, una reducción en el área del espongiotrofoblasto (*) al día 3 pi, mientras que al día 4 pi se identificó un aumento de ellas (#), $p \leq 0,05$.

Evaluación de proliferación y muerte celular

La proliferación se redujo significativamente en ambos grupos infectados. Hubo un aumento significativo en la apoptosis en comparación a sus correspondientes controles (**Figura 34**).

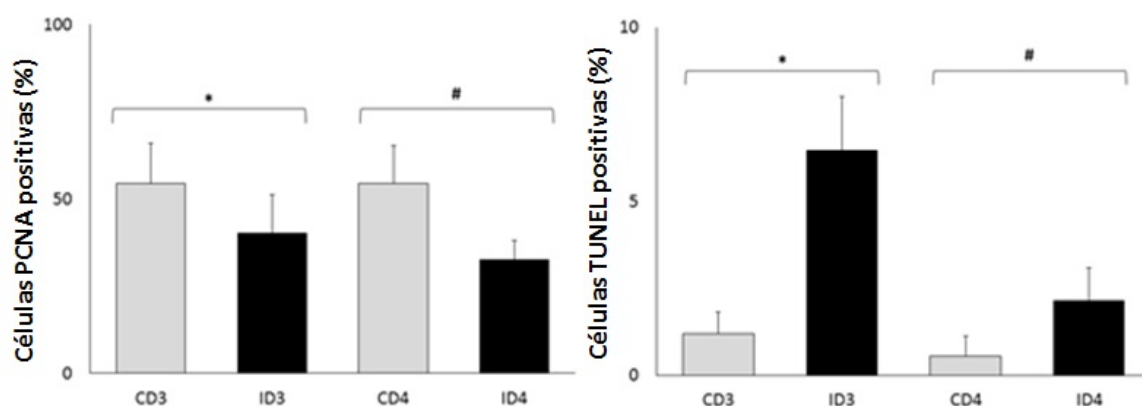


Figura 34. Evaluación de la proliferación y muerte celular. La proliferación (% de células positivas a PCNA) se redujo significativamente en ambos grupos infectados (*, #), mientras que la apoptosis (% de células TUNEL positivas) aumentó significativamente (*, #), $p \leq 0,05$.

Cambios vasculares

El área positiva a la lectina BSA-1 correspondiente a la superficie del endotelio capilar fetal se redujo significativamente en ambos grupos infectados (**Figura 35**).

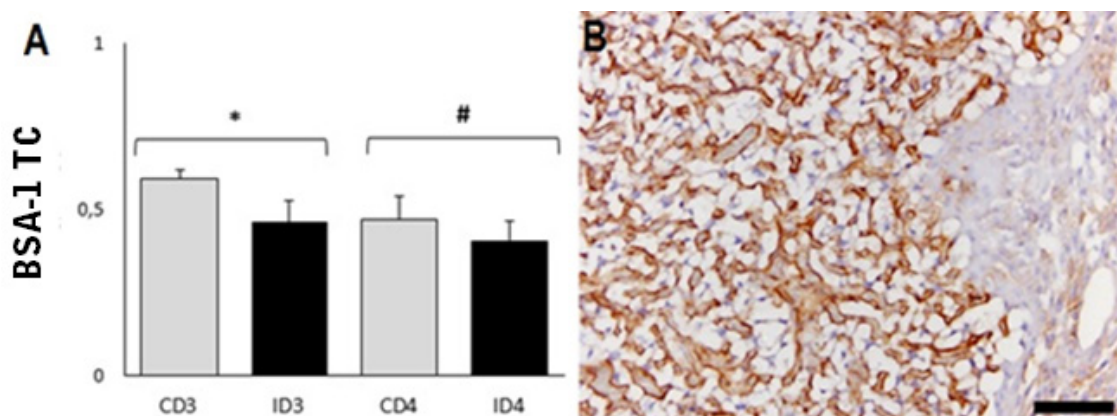


Figura 35. Lectinohistoquímica en las placentas de ratonas. **A.** Reducción significativa del área marcada correspondiente a la superficie de los capilares endoteliales fetales en ambos grupos infectados (ID3 - * - e ID4 - & -), $p < 0.05$. **B.** Marcado de BSA-1 en la placenta de ratonas infectadas en el día 4 pi. TC: tejido completo. Bar = 50 μm .

DISCUSIÓN

La infección por EHV-1 genera diversas alteraciones en equinos de todo el mundo, entre ellas adquieren relevancia los trastornos reproductivos que generan pérdidas económicas en la industria hípica. Es por eso que se considera una de las virosis más importantes ya que ocasiona bajas en los establecimientos de cría como consecuencia de los abortos y del síndrome neonatal que generalmente conduce a la muerte del potrillo.

Considerando que el aborto es un evento multifactorial, la hipótesis de esta tesis postula que el EHV-1 genera en la placenta variaciones en los niveles de expresión de genes que codifican para citoquinas, en la expresión de ellas y en el número de células inmunes, cambios que comprometerían la continuidad de la gestación. En este marco se comparó la expresión de citoquinas de gran relevancia durante la preñez y la infección viral en úteros y placentas de ratonas infectadas experimentalmente en el segundo tercio de preñez. Además, y debido a la imposibilidad de analizar cambios en el número de células inmunes, se estudiaron otros aspectos en un principio no considerados y que podrían estar alterados durante la infección en las placentas, como los cambios vasculares y morfológicos, y las modificaciones en los índices de proliferación y muerte celular.

En la primera etapa se trabajó en definir el momento para la toma de muestras y el análisis de las lesiones en útero y las UFP. Como el inicio y la gravedad de los signos clínicos varían con la dosis y la cepa del virus inoculado ([Walker y col., 1999b](#)), para todo el trabajo se utilizó la cepa AR8, previamente estudiada desde el punto de vista genómico y de su

patogenicidad por nuestro grupo ([Fuentealba y col., 2011](#); [Zanuzzi y col., 2014](#)). Considerando que [Zanuzzi y col. \(2014\)](#), utilizando 20.000 partículas virales como inóculo recuperaron virus de plasma rico en leucocitos en el día 1 pi, pensamos inicialmente que un día de viremia sería suficiente para que el virus llegue al útero y UFP, y el día 6 pi podría ser el adecuado para encontrar lesiones y aislar virus. Sin embargo, al no encontrar lesiones ni aislar virus al día 6 pi, se decidió realizar el muestreo a los días 3 y 4 pi, dos momentos más próximos al inicio de la viremia, además de utilizar para cada inoculación una mayor cantidad de partículas virales. De esta manera, logramos recuperar virus en plasma rico en leucocitos hasta el día 2 pi.

Los signos clínicos observados en nuestra segunda etapa experimental no fueron tan severos como los descritos por [Awan y col. \(1991\)](#) luego de la inoculación intranasal de las cepas AB4 y 1939 en la mitad de la gestación. Resultados similares a los nuestros fueron descritos por [Walker y col. \(1999\)](#) utilizando la cepa HVS25A, y también por [Iwai y col. \(1998\)](#) con la cepa HH1, aunque a idéntica cantidad de partículas infectivas los animales infectados con esta última cepa presentaron signos más severos. El AV, la detección de ADN viral por PCR y de Ag virales por IHQ resultaron positivos en pulmón hasta el día 4 pi, confirmando el establecimiento de la infección. No obstante, los hallazgos histológicos e inmunohistoquímicos en pulmón fueron menos evidentes que los descritos por [Awan y col. \(1991\)](#), [Bartels y col. \(1998\)](#) y [Walker y col. \(1999b\)](#), quienes utilizaron otras cepas de EHV-1. La falta de detección de Ag de EHV-1 por

IHQ en el hígado y en el bazo, no concuerdan con el AV positivo y la detección de ADN por PCR. Una posible explicación a estos resultados positivos podría ser que los glóbulos blancos que transportaron al virus alcanzaron estos órganos mientras circulaban en sangre, sin que hubiese replicación viral en los tejidos. La replicación viral en el hígado y el bazo como resultado de una infección sistémica no es frecuente, y solo fue descrita en fetos equinos abortados (Jönsson y col., 1989; Mukaiya y col., 2000) y, con menos frecuencia, en caballos adultos.

Sugerimos que las variaciones en las dosis de inóculo (Walker y col., 1998), o factores específicos del huésped serían los responsables de la heterogeneidad de los resultados informados en el presente trabajo y los publicados previamente (Galosi y col., 2004; Iwai y col., 1998; Jönsson y col., 1989; Martín Ocampos, 2010).

De modo similar a lo descrito por Awan y col. (1991), nuestra primera observación con respecto al número de UFP encontradas en las ratonas infectadas fue menor que en el grupo control, si bien las diferencias no fueron estadísticamente significativas. En un principio atribuimos esta particularidad al hecho de que el estrés producido por el manejo de los animales luego de la implantación y durante el primer tercio de preñez, podría haber inducido reabsorciones; sin embargo, en el momento de la necropsia no se pudieron registrar. Es por eso que pensamos que la disminución en número de UFP podría indicar el suceso de abortos individuales de fetos que se hubieran infectado. Pocos investigadores

podieron detectar Ag virales en los pulmones, el hígado y los tejidos placentarios y fetales ([Awan y col., 1995](#)). En nuestro estudio, las ratonas fueron sacrificadas antes de que ocurriera el parto natural o el aborto, y no fue posible recuperar partículas virales de las placentas y fetos, ni detectar ADN viral o Ag en ellas. Sin embargo, detectamos ADN viral y Ag en los pulmones infectados de las madres. Algunos autores usando al modelo experimental murino han podido realizar AV a partir de fetos y placentas, pero estos resultados estarían relacionados con el uso de otras cepas virales ([Awan y col., 1991](#); [Iwai y col., 1998](#); [Kukreja y col., 1998](#)). [Walker y col. \(1999b\)](#), estudiaron el efecto de la cepa EHV-1 HVS25 en hembras BALB/c preñadas y determinaron que, si bien los efectos respiratorios y sistémicos de la infección por EHV-1 en los fetos fueron esporádicos, se observaron anomalías histológicas en placentas. Estas lesiones podrían indicar que como en el equino, el aborto causado por EHV-1 en ratones no es necesariamente una consecuencia de la infección fetal, si bien podrían estar relacionados con el daño placentario.

Debido a la infección por EHV-1 se produce la activación del sistema inmune con la consecuente expresión de citoquinas. En este trabajo investigamos por primera vez si la expresión de dichas proteínas se altera en el útero y las placentas de ratonas BALB/c infectadas, cambios que también podrían suceder en el hospedador natural. El perfil Th1 productor de IFN- γ y TNF es incompatible con una preñez viable ([Chaouat, 2002](#)), debido a que dichas citoquinas participan en la inmunidad mediada por

células y la respuesta inmune materna está inclinada hacia una inmunidad humoral y no celular.

Los IFNs son una gran familia de proteínas secretadas multifuncionales que participan en la activación del sistema inmune innato y adaptativo, y en la proliferación y apoptosis celulares ([Mor y Cardenas, 2010](#)). Particularmente, el IFN- γ , un IFN de tipo II, se sintetiza una vez que las células infectadas son reconocidas por los linfocitos T activados y las células NK, y es crucial para la activación de respuestas inmunes adaptativas contra diferentes patógenos. En el presente estudio, encontramos un aumento en el ARNm de IFN- γ en el útero de las ratonas infectadas, un resultado que podría interpretarse como parte de una respuesta al estado de infección que promueve el desarrollo de linfocitos T CD8⁺ citotóxicos para tratar de eliminar el virus. Por el contrario, se encontraron resultados opuestos en las placentas infectadas. Con respecto a esto, se sabe que las células de trofoblasto han desarrollado mecanismos para bloquear la señalización de IFN- γ a fin de contribuir a una preñez exitosa evitando el rechazo fetal ([Murphy y col., 2009](#)).

Además, los interferones y otras citoquinas antivirales son sintetizados por células de trofoblasto en respuesta a infecciones virales, como un mecanismo para prevenir la llegada del virus a la placenta y al feto ([Mor y Cárdenas, 2010](#)). Por otro lado, muchos virus han desarrollado diferentes mecanismos evasivos para interferir con la función del IFN- γ en diferentes niveles de la ruta de señalización de esta citoquina ([Goodbourn y col., 2000](#);

[Haller y col., 2006](#); [Sarkar y col., 2015](#)). Sin embargo, se desconoce si el bajo nivel de IFN- γ encontrado en las placentas en el presente trabajo podría atribuirse a la existencia de un mecanismo evasivo de la cepa EHV-1 AR8, o por un efecto protector ejercido por el trofoblasto para prevenir la infección de la placenta y el feto. Asimismo, si bien en este trabajo no se realizó un estudio cuantitativo de las células uNK hemos observado una mayor presencia en las placentas de las ratonas infectadas en relación a los animales del grupo control en un momento de la preñez en las que el número de estas células normalmente se reduce. Teniendo en cuenta que esta población celular también secreta el IFN- γ , TNF- α , entre otras citoquinas ([Croy y col., 2003](#)) sugerimos un rol dual en la infección, tanto por su potencial citotóxico para combatirla, como también contribuyendo en la patogenia de las lesiones encontradas. Se necesitará más estudios a nivel celular y molecular para corroborar y profundizar la función de estas células en la herpesvirosis equina.

El TNF regula los diferentes procesos celulares durante la preñez, como la proliferación celular, la diferenciación y la apoptosis ([Haider y Knöfler, 2009](#)). Sin embargo, también induce efectos adversos para la gestación y está implicado en la patogénesis de varios trastornos reproductivos, dependiendo de sus concentraciones, la distribución de receptores de TNF, la duración de la estimulación de TNF y los tipos de células implicados ([Haider y Knöfler, 2009](#); [Azizieh y Raghupathy, 2015](#)).

Como se observó para IFN- γ , en este trabajo se encontró una disminución de ARNm de TNF en las placentas infectadas, pero a nivel proteico los valores fueron más altos, posiblemente debido a su origen sistémico. Por el contrario, los resultados a nivel uterino se correspondieron con la respuesta esperada frente a una infección viral, debido al aumento en los valores de TNF, tanto en los niveles de expresión transcripcional como traduccional.

Los aumentos en los niveles de IFN- γ y TNF aquí encontrados en las ratonas inoculadas con EHV-1 con respecto al grupo control concuerdan con la hipótesis que postula [Wegmann \(1993\)](#) en la cual afirma que tanto el IFN- γ como el TNF pueden ser los causantes de la muerte fetal al activar la inmunidad mediada por células.

Por otro lado, la IL-10 tiene efectos protectores durante la preñez, ya que inhibe la secreción de TNF e IFN- γ y, por lo tanto, contribuye a un desarrollo normal de la gestación ([Broguin Moreli y col., 2012](#)). Aquí, observamos una regulación positiva de esta citoquina en las placentas y en el útero de ratonas infectadas. La expresión de IL-10 durante la infección por EHV-1 se puede exacerbar para proteger aun más a los órganos de los efectos negativos de los procesos inflamatorios, pero también para restaurar la homeostasis inmunológica. Sin embargo, también es importante mencionar que durante ciertas infecciones virales, IL-10 tiene un papel diferente. De hecho, se ha determinado que IL-10 está involucrada en el establecimiento y la perpetuación de la persistencia viral. Los virus que generan infección

latente, como EHV-1, pueden codificar sus propios homólogos de IL-10 para modular la respuesta inmune y facilitar su replicación, diseminación y / o persistencia ([Wilson y Brooks, 2011](#)).

Varios alphaherpesvirus son capaces de controlar la respuesta inmune del huésped bloqueando o modulando la expresión de citoquinas antivirales ([Paladino y Mossman, 2009](#)). [Sarkar y col.\(2015\)](#) demostraron que la cepa EHV-1 T953, aislada de un caballo que padeció una enfermedad neurológica, suprime la respuesta antiviral de tipo IFN-1 *in vitro*, resultado que concuerda con los aquí determinados para IFN-γ. [Wagner y col., \(2008\)](#) compararon *in vitro* los efectos de una cepa EHV-1 neuropatogénica y de dos abortígenas sobre la expresión de IFN-α utilizando células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de potros, yeguas gestantes y no gestantes, y determinaron que la expresión de IFN-α fue mayor en los cultivos celulares infectados con cualquiera de las tres cepas que en los controles. [Wimer y col. \(2011\)](#) también informaron una inducción similar de IFN-α producida por dos cepas abortígenas y una neuropatogénica en PBMC equinas. Como puede observarse, la mayoría de los resultados se obtuvieron *in vitro* y no existe un consenso general sobre los efectos de EHV-1 en la expresión de citoquinas, ya que la respuesta varía con la cepa del virus y las líneas celulares experimentales utilizadas. Por otro lado, en el modelo *in vivo*, los mecanismos inmunológicos implicados son muy complejos, debido a la contribución y la interacción de diferentes tipos celulares y componentes extracelulares. Así, [Cheeran y col. \(2007\)](#) no pudieron detectar transcritos

de IL-10 e IFN- γ en tejidos cerebrales y de médula espinal de caballos infectados por EHV-1. Se desconoce si todas las cepas virales, tanto neuropatógenas como abortigénicas, conservan la capacidad para controlar la respuesta inmune de una forma u otra en los modelos *in vivo*.

Las células Treg juegan un papel relevante en el mantenimiento de la tolerancia inmunológica para el feto alogénico por lo que son indispensables para el establecimiento de la preñez, manteniéndose en niveles elevados durante toda la gestación (Zenclussen y col., 2006). El factor de transcripción del gen Foxp3 es ampliamente utilizado para identificarlas. Rowe y col. (2012) han descrito el rol protector de las células Treg en la defensa del huésped contra patógenos virales. Las alteraciones en el funcionamiento de estas células han sido asociadas con la inducción de abortos en un modelo murino bien establecido (Zenclussen, 2005). En nuestros estudios los niveles de expresión de ARNm de Foxp3, tanto en placentas como en útero, se redujeron durante el proceso de infección. Estos resultados concuerdan con los publicados por Ge y col. (2008) al estudiar los efectos de *T. gondii* en un modelo de ratonas preñadas.

En el caso de IL-4 los niveles de expresión de ARNm en útero y placentas fueron menores durante el proceso de infección. A diferencia de nuestros resultados, Woudwyk (2013) describió incrementos en los niveles de IL-4 en el grupo infectado con *T. foetus*, y lo adjudicó a la gran producción de dicha citoquina por parte de los eosinófilos que intervinieron en la reacción inflamatoria. La IL-4, perteneciente a un perfil Th2, genera un

microambiente adecuado y protector para el desarrollo embrionario y fetal ([Wegman y col., 1993](#)). Estos datos sugieren que la pérdida fetal causada por EHV-1 puede ser independiente de la infección viral y que la disminución de las células Treg e IL-4 durante la infección puede representar un nuevo mecanismo patogénico del aborto causado por este patógeno.

Un rol clave de la IL-12 es favorecer la diferenciación de las células T CD4+ en un perfil Th1, representando el estímulo de mayor potencia. Además esta citoquina induce la producción de IFN- γ por células NK y células T CD8+ activadas, por lo que aumenta la actividad citolítica de linfocitos T y NK. A su vez, el IFN- γ aumenta la producción de IL-12, definiéndose así un circuito positivo de retroalimentación ([Williamson y col., 2011](#); [Vermeulen, 2011](#)). En nuestro trabajo se pudo determinar un aumento sérico de IL-12, que podría explicarse, por lo recién expuesto, como una respuesta inmune frente a la infección del virus. De manera contraria, no se pudo determinar si había síntesis local en útero y placenta, lo que consideramos que pueda deberse al efecto del “factor bloqueante inducido por progesterona”, una proteína inmunomoduladora por medio de la cual la progesterona ejerce varios de sus efectos inmunológicos; entre ellos, bloquear la secreción de IL-12 por los linfocitos ([Luchetti y col., 2008](#)) y, de esta manera, impedir la diferenciación de los linfocitos a un perfil Th1, manteniendo un estado de inmunosupresión controlado.

Aunque la mayoría de estos cambios pueden ser inducidos específicamente por el virus, se sabe que las variaciones en la producción de

citoquinas placentarias también ocurren después de los cambios en la tensión de oxígeno ([Benyo y col., 1997](#); [Royle y col., 2009](#)). La congestión vascular presente en las placentas infectadas reduce la tensión normal de oxígeno y, en consecuencia, también podría haber afectado la síntesis, secreción y regulación local de las citoquinas.

Durante la implantación de los roedores, el útero responde a través de procesos secuenciales de proliferación, diferenciación y regresión en distintas regiones del endometrio. El balance entre la apoptosis y la proliferación celular son esenciales para la implantación del blastocisto y el mantenimiento de la gestación. En los sitios de implantación, la adhesión inicial del blastocito se ve acompañada por la apoptosis de las células del epitelio uterino inducido por las células del trofoblasto. En los sitios de implantación al perderse las células epiteliales, el trofoblasto toma contacto con el endometrio y se induce la reacción decidual ([Bell, 1983](#), [Gu y col., 1994](#); [Woudwyk, 2013](#)).

La proliferación y la muerte celular ocurren cíclicamente en el útero y la placenta en condiciones fisiológicas ([Joswig y col., 2003](#)), y también pueden verse alteradas por varios estados infecciosos y no infecciosos.

Muchos autores han investigado cambios histológicos producidos por diferentes cepas de EHV-1 en diferentes estados de la gestación ([Awan y col., 1991, 1995](#); [Inazu y col., 1993](#); [Iwai y col., 1998](#); [Walker y col., 1999a, 1999b](#); [Smith y col., 2000](#)). En esta tesis encontramos cambios vasculares, como ya había sido informado por Walker y col. ([1999a y b](#)) en ratones, y por

[Allen y Bryans \(1986\)](#) en yeguas, y una reducción en el área vascular fetal (recubierta por endotelio) del laberinto mediante el uso de lectina BSA-1, que no se ha documentado anteriormente. Por lo tanto la congestión observada ocurriría en los espacios vasculares maternos (no recubiertos por endotelio). El aumento en el área del laberinto podría deberse a la congestión observada en los espacios sanguíneos maternos. La reducción del área de espongiotrofoblasto se podría asociar con la necrosis producida como consecuencia de la congestión, esta era menos evidente hacia el día 4 pi.

En las placentas infectadas encontramos una reducción en la proliferación celular y un aumento en la apoptosis. En otras enfermedades, como en la diabetes de ratas en las que se produce isquemia útero-placentaria ([Gül y col., 2015](#)), se ha documentado en las placentas un aumento significativo en la apoptosis y la proliferación celular, esta última sería una respuesta compensatoria. Aquí, inferimos que la disminución de la proliferación en las placentas de las ratonas infectadas, pese a tener lesiones isquémicas, podría deberse solo a una cuestión de insuficiencia temporal. Como observaron otros autores en la infección por el *alphaherpesvirus caprino* 1, el aumento de la apoptosis puede ser utilizado por el virus para mejorar la difusión eficiente de su progenie a las células vecinas, como los macrófagos ([Pagnini y col., 2005](#); [Longo y col., 2009](#)).

Se ha sugerido que los trofoblastos infectados por EHV-1 ([Mukaiya y col., 2000](#)) o por el EHV-9 neurotrófico, que comparte características serológicas con EHV-1 y también induce el aborto ([El-Habashi y col., 2011](#)),

pueden suprimir o limitar la replicación del virus, un hecho que podría explicar la dificultad para detectar Ag virales en los tejidos. Es por eso que los resultados pueden variar entre los experimentos llevados a cabo por los autores y es difícil compararlos ya que la mayoría de estos estudios se desarrollaron utilizando diseños experimentales que variaron en las dosis, vía y días de preñez seleccionados para la inoculación del virus, así como en los puntos de tiempo pi analizados.

Pese a los importantes aportes del presente trabajo, muchos aspectos de la respuesta inmune *in vivo* e *in vitro* a la infección por EHV-1 en el huésped natural así como en el modelo murino experimental deben seguir siendo explorados.

CONCLUSIONES

- Los efectos de EHV-1 durante la preñez dependen de diferentes mecanismos patogénicos en los que los cambios vasculares, la muerte y la proliferación celular y la expresión local de citoquinas están involucrados.
- El momento más adecuado para los análisis histopatológicos, inmunohistoquímicos y moleculares en el estudio de la respuesta inmune local en la patogenia del aborto fue entre los días 3 y 4 pi.
- En los pulmones de todos los grupos infectados con EHV-1 se observaron cambios histopatológicos característicos de este virus que nos permitieron confirmar la infección.
- Las placentas de las ratonas infectadas mostraron congestión vascular general en el laberinto y ocasionales trombos en pequeños vasos de las capas de espongiotrofoblasto y decidua. Estos cambios pueden estar relacionados con la regulación local de las citoquinas.
- En las placentas infectadas se encontró una reducción en la proliferación celular y un aumento en la apoptosis.
- Se observó una reducción en el área vascular endotelial del laberinto que podría ser secundaria a la congestión presente en las placentas.
- La infección en ratonas preñadas BALB/c generó cambios a nivel de la respuesta inmune en la barrera útero-placentaria que podrían

intervenir en la interrupción de la gestación. Se observa que hubo un fuerte incremento de la respuesta Th1, mayormente representado por IFN- γ : el mecanismo efector más importante propio de la inmunidad antiviral, que tiende a controlar la infección, pero pudiendo ser perjudicial para la continuidad de la gestación. Por otro lado se observó una respuesta Th2 y tolerogénica, cuyo fin podría ser restaurar el balance homeostático ante la infección.

- La comprensión del impacto inmunológico de la infección sistémica y local de EHV-1 en el modelo murino ayudará a abordar estudios en equinos para mejorar las estrategias profilácticas y terapéuticas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Alber DG, Greensill J, Killington RA, Stokes A. Role of T-cells, virus neutralising antibodies, and complement-mediated antibody lysis in the immune response against equine herpesvirus type-1 (EHV-1) infection of C3H (H-2k) and BALB/c (H-2d) mice. *Res Vet Sci.* 1995; 59: 205-213.
2. Allen GP, Yeargan MR, Bryans JT. Alterations in the equine herpesvirus 1 genome after in vitro and in vivo virus passage. *Infect Immun.* 1983; 40(1): 436–439.
3. Allen GP, Yeargan MR, Turtinen LW, Bryans JT. A new field strain of equine abortion virus (equine herpesvirus-1) among Kentucky horses. *Am J Vet Res.* 1985; 46(1):138-140.
4. Allen GP, Bryans JT. Molecular epizootiology, pathogenesis, and prophylaxis of equine herpesvirus 1 infections. *Prog Vet. Microbiol Immunol.* 1986; 2: 78-144.
5. Allen GP, Slater JD, Smith KC. Equid herpesvirus-1 (EHV-1) and -4 (EHV-4) infections. In *Infectious diseases of Livestock*, J.A.W.a.T. Coetzer, R.C., ed. (Cape Town, Oxford Press). 2004; pp. 829-859.
6. Allen GP, Breathnach CC. Quantification by real-time PCR of the magnitude and duration of leucocyte-associated viraemia in horses infected with neuropathogenic vs. non-neuropathogenic strains of EHV- 1. *Equine Vet J.* 2006; 38(3) 252-257.
7. Allen MP, Nilsen-Hamilton M. Granzymes D, E, F, and G Are Regulated Through Pregnancy and by IL-2 and IL-15 in Granulated Metrial Gland Cells. *J Immunol.* 1998; 161: 2772-2779.
8. Aluvihare VR, Kallikourdis M, Betz AG. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nat Immunol.* 2004; 5: 266–271.
9. Aplin JD, Kimber SJ. Trophoblast-uterine interactions at implantation. *Reprod Biol Endocrinol.* 2004; 2:48.

10. Arias ME, Villegas J. Avances en inmunidad gestacional. *Int J Morphol*. 2010; 28(3):713-718.
11. Audonnet JC, Winslow J, Allen G, Paoletti E. Equine herpesvirus type 1 unique short fragment encodes glycoproteins with homology with herpes simplex virus type 1 gD, gI and gE. *J Gen Virol*. 1990; 71: 2969 - 2978.
12. AVMA Panel on Euthanasia. American Veterinary Medical Association. "2000 Report of the AVMA panel on euthanasia." *J Am Vet Med Assoc*. 2001; 218, 669–696.
13. Awan AR, Chong Y, Field HJ. The pathogenesis of equine herpesvirus type 1 in the mouse: a new model for studying host responses to the infection. *J Gen Virol*. 1990; 71: 1131-1140.
14. Awan AR, Gibson JS, Field HJ. A murine model for studying EHV-1-induced abortion. *Res Vet Sci*. 1991; 51: 94-99.
15. Awan AR, Field HJ. Effects of phosphonylmethoxyalkyl derivatives studied with a murine model for abortion induced by equine herpesvirus 1. *Antimicrob Agents Chemother*. 1993; 37: 2478-2482.
16. Awan AR, Baxi M, Field HJ. EHV-1-induced abortion in mice and its relationship to stage of gestation. *Res Vet Sci*. 1995; 59: 139-145.
17. Azizieh FY, Raghupathy RG. Tumor necrosis factor- α and pregnancy complications: a prospective study. *Med. Princ. Pract*. 2015; 24: 165-170.
18. Bancroft JD, Stevens A. *Theory and Practice of Histological Techniques*, Churchill Livingstone, Edinburgh. 1990.
19. Baraño RI. *Inmunología de la gestación. Reproducción*. 2010; 25:168-184.
20. Barrientos G, Tirado-González I, Klopp BF, Karimi K, Arck PC, García MG, et al. The impact of dendritic cells angiogenic responses at the fetal-maternal interface. *J Reprod Immunol* 2009; 83(1-2): 85-94
21. Bartels T, Steinbach F, Hahn G, Ludwig H, Borchers K. In situ study on the pathogenesis and immune reaction of equine herpesvirus type 1 (EHV-1) infections in mice. *Immunology*. 1998; 93: 329-334.

22. Baxi MK, Efsthathiou S, Lawrence G Whalley JM, Slater JD, Field HJ. The detection of latency associated transcript of equine herpesvirus 1 in ganglionic neurons. *J Gen Virol*. 1995; 76: 3113 - 18.
23. Baxi MK, Borchers K, Bartels T, Schellenbach A, Baxi S, Field HJ. Molecular studies of the acute infection, latency and reactivation of equine herpesvirus-1 (EHV-1) in the mouse model. *Virus Res*. 1996; 40: 33-45.
24. Bell SC. Decidualization: regional differentiation and associated function. *Oxf Rev Reprod Biol*. 1983; 5: 220-271.
25. Benyo DF, Miles TM, Conrad KP. Hypoxia stimulates cytokine production by villous explants from the human placenta. *J Clin Endocrinol. Metab*. 1997; 82: 1582-1588.
26. Bijovsky AT, Zorn TMT, Abramsohn PA. Remodeling of the Mouse Endometrial Stroma during the Preimplantation Period. *Acta Anatomica*. 1992; 144: 231-234.
27. Bizargity P, Bonney EA. Dendritic cells: a family portrait at mid-gestation. *Immunology*. 2009; 126: 565-578.
28. Blois SM, Kammerer U, Alba SC, Tometten MC, Shaikly V, Barrientos G, et al. Dendritic cells: key to fetal tolerance?. *Biol Reprod*. 2007; 77: 590-598.
29. Brogin Moreli J, Cirino Ruocco AM, Vernini JM, Rudge MV, Calderon IM. Interleukin 10 and tumor necrosis factor-alpha in pregnancy: aspects of interest in clinical obstetrics. *ISRN Obstet Gynecol*. 2012; 230742.doi: 10.5402/2012/230742.
30. Bronson FH, Dagg CP, Snell GD. Reproduction. In: *Biology of the Laboratory mouse*. Cap. 11. Snell, G.D. (ed). Blakiston, Philadelphia. 1964; 187-204.
31. Carter J, Saunders VA. Herpesviruses (and other DNAs virus). *Virology Principles And Applications*, John Wiley & Sons Ltd, Liverpool, UK. 2007; 121-35.
32. Chantakru S, Miller C, Roach LE, Kuziel WA, Maeda N, Wang WC, et al. Contributions from self-renewal and trafficking to the uterine NK cell population of early pregnancy. *J Immunol*. 2002; 168: 22-28.

33. Chaouat G, Zourbas S, Ostojic S, Lappree-Delage G, Dubanchet S, Ledee N, Martal J. A brief review of recent data on some cytokine expressions at the materno-foetal interface which might challenge the classical Th1/Th2 dichotomy. *Journal of Reproductive Immunology*. 2002; 53: 241–256.
34. Charalambous C, Drakou K, Nicolaou S, Georgiades P. Novel spatiotemporal glycome changes in the murine placenta during placentation based on BS-I lectinbinding patterns. *Anat Rec*. 2013; 296: 921–932.
35. Cheeran MC, Hu S, Palmquist JM, Bakken T, Gekker G, Lokensgard JR. Dysregulated interferon-gamma responses during lethal cytomegalovirus brain infection of IL-10-deficient mice. *Virus Res*. 2007; 130: 96–10.
36. Chesters PM, Allsop R, Purewal A, Edington N. Detection of latency-associated transcripts of equid herpesvirus 1 in equine leukocytes but not in trigeminal ganglia. *J Virol*. 1997; 71: 3437–43.
37. Colle CF, Tarbet EB, Grafton WD, Jennings SR, O'Callaghan DJ. Equine herpesvirus-1 strain KyA, a candidate vaccine strain, reduces viral titers in mice challenged with a pathogenic strain. *Virus Res*. 1996; 43: 111-124.
38. Cook HC. Carbohydrates. En: *Theory and Practice of Histological Techniques*. Bancroft JD and Stevens A (eds). 3^{ed}. 1990; 177-213.
39. Coombs DK, Patton T, Kohler AK, Soboll G, Breathnach C, Townsend HG, Lunn DP. Cytokine responses to EHV-1 infection in immune and non-immune ponies. *Vet Immunol Immunopathol*. 2006; 111(1-2): 109-16.
40. Crabb BS, Studdert MJ. Comparative studies of the proteins of equine herpesviruses 4 and 1 and asinine herpesvirus 3: antibody response of the natural hosts. *J Gen Virol*. 1990; 71(9): 2033-41.
41. Crabb BS, Studdert MJ. Equine herpesviruses 4 (Equine rhinopneumonitis virus) and 1 (Equine abortion virus). *Adv Virus Res*. 1995; 45: 153-90.
42. Croy BA, Guimond MJ, Luross J, Hahnel A, Wang B, Heuvel MVD. Uterine natural killer cells do not require interleukin-2 for their differentiation or maturation. *Am J Reprod Immunol*. 1997; 37: 463–470.

43. Croy BA. Hasn't the time come to replace the term metrial gland? *J Reprod Immunol.* 1999; 42: 127–129.
44. Croy BA, He H, Esadeg S, Wei Q, McCartney D, Zhang J, et al. Uterine natural killer cells: insights into their cellular and molecular biology from mouse modelling. *Reproduction.* 2003; 126: 149-160.
45. Croy BA, Wessels J, Linton N, Tayade C. Comparision of immune cell recruitment and function in endometrium during development of epitheliochorial (pig) and hemochorial (mouse and human) placentas. *Placenta.* 2009; 23: 23-31.
46. Csellner H, Walker C, Wellington JE, McLure LE, Love DN, Whalley JM. EHV-1 glycoprotein D (EHV-1 gD) is required for virus entry and cell-cell fusion, and an EHV-1 gD deletion mutant induces a protective immune response in mice. *Arch Virol.* 2000; 145(11): 2371-85.
47. Dallenbach-Hellweg G, Nette G. Morphological and histochemical observations on trophoblast and decidua of the basal plate of the human placenta at term. *Am J Anat.* 1964; 115:309-26.
48. Davies CJ. Why is the fetal allograft not rejected? *J Anim Sci.* 2007; 85: E32-E35.
49. Davison A, Eberle R, Ehlers B, Hayward GS, McGeoch DJ, Minson AC, et al. The order Herpesvirales. *Arch Virol.* 2009; 154(1): 171-177.
50. De Diego AI. (Ed). Guía para el estudio de las enfermedades infecciosas de los animales (aves y mamíferos) Ed. del autor. Bs As, Argentina. 1974; p. 587.
51. De los Santos JM, de los Santos MJ, Remohí J, Pellicer P, Serra V. Mecanismos inmunológicos de las gestación. *Rev Iberoamericana de Fertilidad.* 2005;22:213-223.
52. Del Piero F, Wilkin S. Pulmonary vasculotropic EHV-1 infection in equids. *Vet Pathol.* 2001; 38(4): 474-475.
53. Duc-Goiran P, Mignot TM, Bourgeois C, Ferré F. Embryo-maternal interactions at the implantation site: a delicate equilibrium. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1999; 83(1):85-100.

54. Dunowska M. A review of Equid herpesvirus 1 for the veterinary practitioner. Part A: clinical presentation, diagnosis and treatment. *N Z Vet J.* 2014; 62:4, 171-178.
55. Dunowska M. A review of Equid herpesvirus 1 for the veterinary practitioner. Part B: pathogenesis and epidemiology. *N Z Vet J.* 2014; 62:4, 179-188.
56. Edington N, Bridges CG, Patel JR. Endothelial cell infection and thrombosis in paralysis induced by equid herpesvirus - 1: equine stroke. *Arch Virol.* 1986; 90: 11 - 124.
57. Edington N, Smyt HB, Griffiths L. The role of endothelial cell infection in the endometrium, placenta and foetus of equid herpesvirus 1 (EHV-1) abortions. *J Comp Pathol.* 1991; 104: 379-387.
58. El-Habashi N, El-Nahass E, Fukushi H, Nayel M, Hibi D, Sakai H, et al. Effects of equine herpesvirus-9 infection in pregnant mice and hamsters. *J. Comp. Pathol.* 2011; 144: 103-112.
59. Entrican G. Immune regulation during pregnancy and host-pathogen interactions in infectious abortion. *J Comp Pathol.* 2002; 126: 79-94.
60. Eöry M., Zanuzzi CN, Fuentealba NA, Sguazza GH, Gimeno EJ, Galosi CM, Barbeito CG. Effects of different anesthetics in the murine model of Equine herpesvirus 1 infection. *Vet Pathol.* 2013; 50: 849-856.
61. Erlebacher A. Immune surveillance of the maternal/fetal interface: controversies and implications. *Trends Endocrinol Metabol.* 2010; 21: 428-34.
62. Etcheverrigaray ME, Sciutto D, Schudel AA, Perez Azumendi R. Rinoneumonitis equina I: detección de anticuerpos precipitantes en caballos de la provincia de Buenos Aires. *Revista Militar Veterinaria.* 1978; 25: 173-5.
63. Etcheverrigaray ME, Oliva GA, Gonzalez ET, Nosetto EO, Martin AA. Comportamiento de una cepa de HVE-1 aislada de un feto abortado. *Rev mil Vet.* 1982; 30: 138-9.
64. Fauquet C, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA. Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. Eighth Oxford, United Kingdom [Online]

<http://www.ictvdbrothamsted.ac.uk/Ictv/ICTV8thReport%20Master%20species%20list.htm>. 2005.

65. Fainboim L, Arruvito L. Tolerancia inmunológica y células T reguladoras. Introducción a la inmunología humana. VI Edición. Eds Fainboim L y Geffner J. Editorial Panamericana. 2011; 327 a 340.
66. Feng, Y, Thompson YJ, Lewis JB, Caughman GB. Expression and Function of the Equine Herpesvirus 1 Virion Associated Host Shutoff Homolog. J Virol. 1996; 70, 8710 - 8718.
67. Field HJ, Awan AR, de la Fuente R. Reinfection and reactivation of equine herpesvirus-1 in the mouse. Arch Virol. 1992; 123: 409-419.
68. Flaminio MJ, Antczak DF. Inhibition of lymphocyte proliferation and activation: a mechanism used by equine invasive trophoblast to escape the maternal immune response. Placenta 2005; 26: 148-159.
69. Flint S, Enquist LW, Racaniello VR, Skalka AM. Structure, genome organization, and infectious cycles. En: Principles of virology, 2nd edition ASM Press, Washington DC, USA. 2004; 811-812.
70. Fuentealba NA, Sguazza GH, Eöry ML, Valera AL, Pecoraro MR, Galosi CM. Genomic study of Argentinean Equid herpesvirus 1 strains. Rev Argent Microbiol. 2011; 43(4):273-7.
71. Fuentealba NA, Sguazza GH, Scrochi MR, Bravi ME, Zanuzzi C, Corva S, et al. Production of equine herpesvirus 1 recombinant glycoprotein D and development of an agar gel immunodiffusion test for serological diagnosis. J Virol Methods. 2014; 202:15-8.
72. Galosi CM, Nosetto EO, Gimeno EJ, Gomez Dunn C, Etcheverrigaray ME, Ando Y. Equine Herpesvirus-1 (EHV-1): Characterisation of a viral strain isolated from equine plasma in Argentina. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epizz. 1989; 8 (1): 117-122.
73. Galosi CM, Norimine J, Echeverría MG, Oliva GA, Nosetto EO, Etcheverrigaray ME, et al. Diversity of genomic electropherotypes of naturally occurring equine herpesvirus 1 isolates in Argentina. Braz J Med Biol Res. 1998;31(6):771-774

74. Galosi CM, Vila Roza MV, Oliva GA, Pecoraro MR, Echeverría MG, Corva S, et al. A polymerase chain reaction for detection of equine herpesvirus-1 in routine diagnostic submissions of tissues from aborted fetuses. *J. Vet. Med. B Infect. Dis Vet. Public Health*. 2001; 48: 341–346.
75. Galosi CM, Barbeito CG, Vila Roza MV, Cid de la Paz V, Ayala MA, Corva SG, et al. Argentine strain of equine herpesvirus 1 isolated from aborted fetus shows low virulence in mouse respiratory and abortion models. *Vet Microbiol*. 2004; 103: 1-12.
76. Galosi CM, Cid de la Paz V, Fernandez LC, Martinez JP, Craig MI, Barrandeguy M, et al. Isolation of equine herpesvirus 2 from the lung of an aborted fetus. *J. Vet. Diagn. Invest*. 2005; 17: 500-502.
77. Galosi CM, Barbeito CG, Martin Ocampos GP, Martinez JP, Ayala MA, Corva SG, et al. An argentine equine herpesvirus strain with special restriction patterns protect mice challenged with a pathogenic strain. *J Vet Med B*. 2006; 53: 412-417.
78. Garber D, Beverley SM, Cohen DM. Demonstration of circularization of herpes simplex virus DNA following infection using pulsed field gel electrophoresis. *Virology*. 1993; 197(1): 459-62.
79. Garfield RE, Irani AM, Schwartz LB, Bytautiene E, Romero R. Structural and functional comparison of mast cells in the pregnant versus nonpregnant human uterus. *Am J Obstet Gynecol* 2006; 194: 261-267.
80. Ge YY, Zhang L, Zhang G, Wu JP, Tan MJ, Hu W, et al. In pregnant mice, the infection of *Toxoplasma gondii* causes the decrease of CD4+CD25+-regulatory T cells. *Parasite Immunol*. 2008; 30: 471-481.
81. Ghanem YM, Ibrahim E, Yamada S, Matsumura T, Osterrieder N, Yamaguchi T, et al. Molecular Characterization of the Equine Herpesvirus 1 Strains RacL11 and Kentucky D. *J Vet Med Sci*. 2007; 69 (5): 573-576.
82. Gibbons AFE, Chang MC. Number of mast cells in the rat uterus with special reference to its relation to hormonal treatment and decidual response. *Biol Reprod*. 1972; 6: 193-203.
83. Gibson JS, Slater JD, Awan AR, Field HJ. Pathogenesis of equine herpesvirus-1 in specific pathogen- free foals: primary and secondary infections and reactivation. *Arch Virol*. 1992; 123: 351-66.

84. Gilkerson JR, Whalley JM, Drummer HE, Studdert MJ, Love DN. Epidemiological studies of equine herpesvirus 1 (EHV-1) in Thoroughbred foals: a review of studies conducted in the Hunter Valley of New South Wales between 1995 and 1997. *Vet Microbiol.* 1999; 68, 15-25.
85. Goehring LS, Wagner B, Bigbie R, Hussey SB, Rao S, Morley PS, et al. Control of EHV-1 viremia and nasal shedding by commercial vaccines. *Vaccine.* 2010; 28(32): 5203-5211.
86. Goodbourn S, Didcock L, Randall RE. Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral response and virus countermeasures. *J Gen Virol.* 2000; 8: 2341-2364.
87. Gray WL, Baumann RP, Robertson AT, Caughman GB, O'Callaghan DJ, Staczek J. Regulation of Equine Herpesvirus type 1 gene expression: characterization of immediate early, early, and late transcription. *Virology.* 1987; 158, 79 - 87.
88. Granzow H, Klupp B, Fuchs W, Veits J, Osterrieder N, Mettenleiter TC. Egress of alphaherpesviruses: comparative ultrastructural study. *J Virol.* 2001; 75, 3675 - 3684.
89. Gu Y, Jow GM, Moulton BC, Lee C, Sensibar JA, Park-Sarge OK, et al. Apoptosis in Decidual Tissue Regression and Reorganization. *Endocrinology.* 1994; 135: 1272-1279.
90. Gül M, Bayat N, Çetin A, Kepekçi RA, Şimşek Y, Kayhan B, Turhan U, et al. Histopathological, ultrastructural and apoptotic changes in diabetic rat placenta. *Balkan Med. J.* 2015; 32: 296-302.
91. Gupta AK, Kaur D, Rattan B, Yadav MP. Molecular Variability in Different Indian Isolates of Equine Herpesvirus-1. *Vet Res Commun.* 2005; 29(8):721–734.
92. Haider S, Knöfler M. Human tumour necrosis factor: physiological and pathological roles in placenta and endometrium. *Placenta.* 2009; 30: 111-123.
93. Haller O, Kochs G, Weber F. The interferon response circuit: induction and suppression by pathogenic viruses. *Virology.* 2006; 344: 119-130.
94. Hauguel-de Mouzon S, Guerre-Millo M. The placenta cytokine network and inflammatory signals. *Placenta* 2006; 27: 794-798.

95. Hartley CA, Wilks CR, Studdert MJ, Gilkerson JR. Comparison of antibody detection assays for the diagnosis of equine herpesvirus 1 and 4 infections in horses. *Am J Vet.* 2005; 66(5):921-928.
96. Heikkinen J, Mo'tto'nen M, Alanen A, Lassila O. Phenotypic characterization of regulatory T cells in the human decidua. *Clin Exp Immunol.* 2004; 136:373–378.
97. Heldens JG, Kersten AJ, Weststrate MW, Van Den Hoven R. Duration of immunity induced by an adjuvanted and inactivated equine influenza, tetanus and equine herpes 1and 4 combination vaccine. *Vet. Q.* 2001; 23: 210-17.
98. Huang T, Lehmann MJ, Said A, Ma G, Osterrieder N. Major histocompatibility complex class I downregulation induced by Equine Herpesvirus type 1 pUL56 is through dynamin-dependent endocytosis. *J Virol.* 2014; 88: 12802-12815.
99. Hunt JS, Petroff MG, McIntire RH, Ober C. HLA-G and immune tolerance in pregnancy. *FASEB J.* 2005;19: 681-693.
100. Hutter S, Knabl J, Andergassen U, Jeschke U. The Role of PPARs in Placental Immunology: A Systematic Review of the Literature. *PPAR Res* 2013; 2013:970276.
101. Ibrahim ESM, Pagmajav O, Yamaguchi T, Matsumura T, Fukushi H. Growth and Virulence Alterations of Equine Herpesvirus 1 by Insertion of a Green Fluorescent Protein Gene in the Intergenic Region between ORFs 62 and 63. *Microbiology and Immunology.* 2004; 48(11): 831-842.
102. Inazu M., Tsuha O., Kirisawa Y, Kawakarni Y, Iwai H. Equid herpesvirus 1 infection in mice. *J Vet Med Sci.* 1993; 55: 119-121.
103. Innes EA, Wright S, Bartley P, Maley S, Macaldowie C, Esteban-Redondo I, et al. The host–parasite relationship in bovine neosporosis. *Vet Immunol Immunopathol.* 2005; 108: 29-36.
104. Iwai H, Kodera A, Noriyuki S, Nakamura A. Effect of equid herpesvirus 1 infection on parturition of mice. *J Equine Sci.* 1998; 9: 25–27.
105. Jabrane –Ferrat N, Siewiera J. The upside of decidual natural killer cells: new developments in immunology of pregnancy. *Immunology.* 2014; 141(4): 490-7.

106. Jönsson L, Beck-Friis J, Renström LH, Nikkila T, Thebo P, Sundquist B. Equine herpes virus 1 (EHV-1) in liver, spleen, and lung as demonstrated by immunohistology and electron microscopy. *Acta Vet Scand.* 1989; 30:141–146.
107. Kruse N, Greif M, Morabadi NF, Marx L, Toyka KV, Rieckmann P. Variations in cytokine mRNA expression during normal human pregnancy. *Clin Exp Immunol.* 2000; 119: 317-322.
108. Krzymowski T, Stefańczyk-Krzymowska S. Advances in understanding the physiological mechanism of maternal immune tolerance to the embryo. *Reprod Biol.* 2012; 12: 265-270.
109. Kukreja A, Love DN, Whalley JM, Field HJ. Study of the protective immunity of co-expressed glycoprotein H and L of equine herpesvirus-1 in a murine intranasal infection model. *Vet Microbiol.* 1998; 60: 1-11.
110. Kydd JH, Smith KC, Hannant D, Livesay GJ, Mumford JA. Distribution of equid herpesvirus-1 in respiratory tract-associated lymphoid tissue: implications for cellular immunity. *Equine Vet J.* 1994; 26: 470-473.
111. Kydd JH, Slater J, Osterrieder N, Lunn DP, Antczak DF, Azab W, et al. Third International Havemeyer Workshop on Equine Herpesvirus type 1. *Equine Vet J.* 2012; 44: 513–517.
112. Lim KJ, Odukoya OA, Ajjan RA, Li TC, Weetman AP, Cooke ID. The role of T-helper cytokines in human reproduction. *Fertil Steril* 2000;73:136-142.
113. Liu F, Guo J, Tian T, Wang H, Dong F, Huang H. Placental trophoblasts shifted Th1/Th2 balance toward Th2 and inhibited Th17 immunity at fetoma-teral interface. *APMIS.* 2011;119:597–604.
114. Longo M, Fiorito F, Marfè G, Montagnaro S, Pisanelli G, De Martino LG, et al. Analysis of apoptosis induced by Caprine Herpesvirus1 in vitro. *Virus Res.* 2009; 145: 227-235.
115. Luchetti CG, Mikó E, Szekeres-Bartho J, Paz DA, Motta AB. Dehydroepiandrosterone and metformin modulate progesterone-induced blocking factor (PIBF), cyclooxygenase 2 (COX2) and cytokines in early pregnant mice. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 2008;111: 200-207.

116. Ma G, Eschbaumer M, Said A, Hoffmann B, Beer M, N. An Equine Herpesvirus Type 1 (EHV-1) Expressing VP2 and VP5 of Serotype 8 Bluetongue Virus (BTV-8) Induces Protection in a Murine Infection Model. *Plos One*. 2012; 7(4): e34425.
117. Ma G, Azab W, Osterrieder N. Equine herpesviruses type 1 (EHV-1) and 4 (EHV-4)—Masters of co-evolution and a constant threat to equids and beyond. *Vet Microbiol*. 2013; 167 (1–2): 123-134.
118. Martín Ocampos GP, Fuentealba NA, Sguazza GH, Jones LR, Cigliano MM, Barbeito CG, et al. Genomic and phylogenetic analysis of Argentinian Equid Herpesvirus 1. *Virus Gene*. 2009; 38(1): 113-17.
119. Martín Ocampos GP. Estudios moleculares-evolutivos y de virulencia en herpesvirus potencialmente abortigénicos para el equino. Tesis de Doctorado en Ciencias Naturales. Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata. 2010.
120. Martinez JP, Fernandez LC, Martin Ocampos GP, Cid de la Paz V, Fuentealba NA, Barrandeguy M, et al. Detection of equine herpesvirus 1 genome 1B in Argentina. *Rev. Sci.Tech. Off. nt. Epizz*. 2006; 25 (3): 1075-79.
121. Martoja R, Martoja M. Técnicas de Histología Animal. Editorial Toray-Masson S.A. Barcelona. 1970.
122. Matson BC, Caron KM. Uterine natural killer cells as modulators of the maternal fetal vasculature. *Int J Dev Biol*. 2014; 58(2-3-4): 199-204
123. Matsumura T, O'Callaghan DJ, Kondo T, Kamad AM. Lack of virulence of the murine fibroblast adapted strain, Kentucky A (K yA) of equine herpesvirus type 1 (EHV-1) in young horses. *Vet Microbiol*. 1996; 48: 353-65.
124. Matsumura T, Kondo T, Sugita S, Damiani AM, O'Callaghan DJ, Imagawa H. An equine herpesvirus type 1 recombinant with a deletion in the gE and gI genes is avirulent in young horses. *Virology*. 1998; 242: 68-79.
125. Matumoto M, Ishizaki R, Shimizu T. Serological survey of equine rhinopneumonitis virus infections among horses in various countries. *Arch Ges Virus Forsch*. 1965; 50: 606-23.
126. Medawar PB. Some immunological and endocrinological problems raised by

evolution of viviparity in vertebrates. *Symp Soc Exp Biol.* 1953; 7: 320-338.

127. McCartan CG, Russell MM, Wood JL, Mumford JA. Clinical, serological and virological characteristics of an outbreak of paresis and neonatal foal disease due to equine herpesvirus-1 on a stud farm. *Vet Rec.* 1995; 136: 7-12.

128. McGeoch DJ, Barnett BC, Maclean CA. Emerging functions of alpha herpes genes. *Semin Virol.* 1993; 4: 125–34.

129. McGeoch DJ, Rixon FJ, Davison AJ. Topics in herpesvirus genomics and evolution. *Virus Res.* 2006; 117: 90 - 104.

130. Moffett A, Loke C. Immunology of placentation in eutherian mammals. *Nat Rev Immunol.* 2006; 6(8):584-94.

131. Moldenhauer LM, Diener KR, Thring DM, Brown MP, Hayball JD, Robertson SA. Cross-presentation of male seminal fluid antigens elicits T cell activation to initiate the female immune response to pregnancy. *J Immunol.* 2009; 182:8080–8093.

132. Molinková D, Skladal P, Celer V. In vitro neutralization of equid herpesvirus 1 mediated by recombinant antibodies. *J Immunol Methods.* 2008; 333(1-2): 186-191.

133. Mor G, Abrahams VM. Potential role of macrophages as immunoregulators of pregnancy. *Reprod Biol Endocrinol* 2003; 1: 119.

134. Mor G, Cardenas I. The Immune System in Pregnancy: A Unique Complexity. *Am J Reprod Immunol.* 2010; 63(6): 425–433.

135. Motta C, Grosso C, Zanuzzi C, Molinero D, Picco N, Bellingeri R, et al. Effect of sildenafil on pre-eclampsia-like mouse model induced by L-name. *Reprod. Domest. Anim.* 2015; 50: 611–616.

136. Mowat AM. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol.* 2003; 3: 331-334.

137. Mukaiya R, Kimura T, Ochiai K, Wada R, Umemura T. Demonstration of equine herpesvirus-1 gene expression in the placental trophoblasts of naturally aborted equine fetuses. *J Comp Pathol.* 2000; 123:119–125.

138. Mumford JA, Rossdale PD. Virus and its relationship to the "poor performance" syndrome. *Equine Vet J.* 1980; 12: 3-9.
139. Mumford JA, Rossdale PD, Jessett DM, Gann SJ, Ousey J, Cook RF. Serological and virological investigations of an equid herpesvirus 1 (EHV-1) abortion storm on a stud farm. *J Reprod Fertil Suppl.* 1985; 35: 509-18.
140. Mumford JA, Hannant D, Jessett DM, O'Neill T, Smith KC, Ostlund EN. Abortigenic and neurological disease caused by experimental infection with equid herpesvirus-1. En: Plowright W and Nakajima H. *Equine Infectious Diseases VII.* Newmarket, Suffolk, R & W Publications. 1994; 261–275.
141. Murphy SP, Tayade C, Ashkar AA, Hatta K, Zhang J, Croy BA. Interferon gamma in successful pregnancies. *Biol Reprod.* 2009;80:848-59.
142. Murray MJ, Del Piero F, Jeffrey SC, Davis MS, Furr MO, Dubovi EJ, et al. Neonatal equine herpesvirus type 1 infection a thoroughbred breeding farm. *J Vet Intern Med.* 1998; 12: 36-41.
143. Nakashima A, Ito M, Shima T, Bac ND, Hidaka T, Saito S. Accumulation of IL-17-positive cells in decidua of inevitable abortion cases. *Am J Reprod Immunol.* 2010;64:4–11.
144. Noronha LE, Antczak DF. Maternal Immune Responses to Trophoblast: The Contribution of the Horse to Pregnancy Immunology. *Am J Reprod Immunol.* 2010; 64(4): 231–244.
145. Nosetto EO, Monina MI, Baschar H, Gallo GG, Galosi CM, Idiart JR, et al. Síndrome Neurológico asociado a Herpes Virus Equino-1(HVE-1). *Med. Vet. Barcelona.* 1985; 2(11): 583-588.
146. Nugent J, Birch-Machin I, Smith KC, Mumford JA, Swann Z, Newton JR, et al. Analysis of Equid Herpesvirus 1 Strain Variation Reveals a Point Mutation of the DNA Polymerase Strongly Associated with Neuropathogenic versus Nonneuropathogenic Disease Outbreaks. *J. Virol.* 2006; 80(8): 4047–4060.
147. Osterrieder N, Wagner R, Pfeffer M, Kaaden OR. Expression of equine herpesvirus type 1 glycoprotein gp14 in *Escherichia coli* and in insect cells: a comparative study on protein processing and humoral immune responses. *J Virol.* 1994; 75: 2041-2046.

148. Osterrieder N, Neubauer A, Brandmuller C, Kaaden O, O'Callaghan D. The Equine Herpesvirus 1 IR6 Protein Influences Virus Growth at Elevated Temperature and Is a Major Determinant of Virulence. *Virology*. 1996; 226, 243–251.
149. Pagnini U, Montagnaro S, Sanfelice di Monteforte E, Pacelli F, De Martino L, Roperto L, et al. Caprine herpesvirus-1 (CapHV-1) induces apoptosis in goat peripheral blood mononuclear cells. *Vet Immunol Immunopathol*. 2005; 103: 283-293.
150. Paladino P, Mossman KL. Mechanisms employed by herpes simplex virus 1 to inhibit the interferon response. *J. Interferon Cytokine Res*. 2009; 29: 599-607. doi: 10.1089/jir.2009.0074. Review.
151. Parr EL, Tung HN, Parr MB. Apoptosis as the mode of uterine epithelial cell death during embryo implantation in mice and rats. *Biol Reprod*. 1987; 36: 211-225.
152. Parr MB, Parr EL. Langerhans Cells and Lymphocyte Subset in the Murine Vagina and Cervix. *Biol Reprod*. 1991; 45: 491-498.
153. Patel JR, Heldens J. Equine herpesviruses 1 (EHV-1) and 4 (EHV-4) – epidemiology, disease and immunoprophylaxis: A brief review. *Vet J*. 2005; 170: 14-23.
154. Peck A, Mellins ED. Plasticity of T-cell phenotype and function: the T helper type 17 example. *Immunology*. 2010; 129: 147-153.
155. Piccinni MP, Romagnani S. Regulation of fetal allograft survival by hormone-controlled Th1- and Th2-type cytokines. *Immunol Res*. 1996; 15:141–150.
156. Pomeranz LE, Reynolds AE, Hengartner CJ. Molecular biology of pseudorabies virus: Impact on neurovirology and veterinary medicine. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2005; 69: 462 - 500.
157. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001;29(9):e45.
158. Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res*. 2002; 30(9):00.

159. Quinn HE, Ellis JT, Smith NC. *Neospora caninum*: a cause of immunemediated failure of pregnancy? *Trends Parasitol.* 2002; 18(9): 391-394.
160. Raghupathy R. Pregnancy: success and failure within the Th1/Th2/Th3 paradigm. *Semin Immunol.* 2001;13:219-227.
161. Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty per cent end points. *Am J Hyg.* 1938; 27:493-497.
162. Rimstad E y Evensen O. The identification of equid herpesvirud 1 in paraffin-embedded tissues from aborted fetuses by polymerase chain reaction and immunohistochemistry. *J Vet Diag Inv.* 1993; 5: 174-83.
163. Rimstad E y Hyllseth B. Equine Herpesviruses 1 and 4: amplification and differentiation by Polymerase Chain Reaction. *Acta Vet. Scand.* 1994; 35: 303-6.
164. Roizman B, Batterson W. *Herpesviruses and their replication.* Raven Press, New York, USA. 1985; p. 497-526.
165. Robertson SA, Guerin LR, Bromfield JJ, Branson KM, Ahlström AC, Care AS. Seminal fluid drives expansion of the CD4+CD25+ T regulatory cell pool and induces tolerance to paternal alloantigens in mice. *Biol Reprod.* 2009; 80:1036–1045.
166. Roizman B, Desrosiers RC, Fleckenstein B, Lopez C, Minson AC, Studdert MJ. The family Herpesviridae: an update. The Herpesvirus Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch. Virol.* 1992; 123: 425-49.
167. Rossant J, Cross J. Placental Development: Lessons from Mouse Mutants *Nat Rev. Genet.* 2001; 2: 538-546.
168. Rowe JH, Ertelt JM, Way SS. Foxp3+ regulatory T cells, immune stimulation and host defence against infection. *Immunology.* 2012; 136(1): 1–10.
169. Royle C, Lim S, Xu B, Tooher J, Ogle R, Hennessy A. Effect of hypoxia and exogenous IL-10 on the pro-inflammatory cytokine TNF-alpha and the anti-angiogenic molecule soluble Flt-1 in placental villous explants. *Cytokine.* 2009; 47: 56-60.

170. Rugh, R. The mouse its reproduction and development. Burgess Publishing Company. 1968.
171. Saito S, Nakashima A, Myojo-Higuma S, Shiozaki A. The balance between cytotoxic NK cells and regulatory NK cells in human pregnancy. *J Reprod Immunol*. 2008; 77:14-22.
172. Saito S, Nakashima A, Shima T, Ito M. Th1/Th2/Th17 and Regulatory T-Cell Paradigm in Pregnancy. *Am J Reprod Immunol*. 2010; 63: 601-610.
173. Sakaguchi S. Naturally arising Foxp-3 expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol*. 2005; 6: 345-352.
174. Sarkar S, Balasuriya UB, Horohov DW, Chambers TM. *Vet Immunol Immunopathol*. 2015; 167: 122-129.
175. Schumacher A, Wafula PO, Bertoja AZ, Sollwedel A, Thuere C, Wollenberg I, et al. Mechanisms of action of regulatory T cells specific for paternal antigens during pregnancy. *Obstet Gynecol*. 2007; 110: 1137–1145.
176. Schumacher A, Wafula PO, Teles A, El-Mousleh T, Linzke N, Zenclussen ML, et al. Blockage of heme oxygenase-1 abrogates the protective effect of regulatory T cells on murine pregnancy and promotes the maturation of dendritic cells. *PLoS One*. 2012; 7: e42301.
177. Slater JD, Gibson JS, Barnett KC, Field HJ. Chorioretinopathy associated with neuropathology following infection with equine herpesvirus-1. *Vet Rec*. 1992; 131: 237-239
178. Slater JD, Borchers K, Thackery AM, Field H. The trigeminal ganglion is a location for quine herpesvirus - 1 (EHV - 1) in latency and reactivation in the horse. *J Gen Virol*. 1994; 75: 2007 - 2016.
179. Smith KC, Whitwell KE, Binns MM, Dolby CA, Hannant D, Mumford JA. Abortion of virologically negative foetuses following experimental challenge of pregnant mares with equid herpesvirus 1. *Equine Vet J*. 1992; 24: 256-259.
180. Smith KC, Whitwell KE, Mumford JA, Gower SM, Hannant D, Tearle JP. An immunohistological study of the uterus mares following experimental infection by equid herpesvirus 1. *Equine Vet J*. 1993; 25: 36-40.

181. Smith KC, Mumford JA, Lakhani K. A comparison of equid herpesvirus 1 (EHV-1) vascular lesions in the early versus late pregnant equine uterus. *J Comp Pathol.* 1996; 114: 231-47.
182. Smith DJ, Iqbal J, Purewal A, Hamblin AS, Edington N. In vitro reactivation of latent equid herpesvirus-1 from CD5+ CD8+ leukocytes indirectly by IL2 or chorionic gonadotrophine. *J Gen Virol.* 1998; 24: 2997-3004.
183. Smith KC, Whitwell KE, Mumford JA, Hannant D, Blunden AS, Tearle JP. Virulence of the V592 Isolate of Equid Herpesvirus-1 in Ponies. *J Comp Path.* 2000; 122: 288–297.
184. Somerset DA, Zheng Y, Kilby MD, Sansom DM, Drayson MT. Normal human pregnancy is associated with an elevation in the immune suppressive CD25+ CD4+ regulatory T-cell subset. *Immunology.* 2004; 112:38–43.
185. Spear P, Longnecker R. Herpesvirus entry: an update. *J Virol.* 2003; 77(19): 10179-85.
186. Spencer TE, Bazer FW. Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. *Reprod Biol Endocrinol.* 2004; 2: 49.
187. Stewart IJ, Peel S. Granulated metrial glands cells at implantation sites of the pregnant mouse uterus. *Anat Embryol.* 1980; 160: 227–238.
188. Stewart J, Bebington CR, Mukhtar DD. Lectin binding characteristics of mouse placental cells. *J Anat.* 2000; 196: 371-378.
189. Stokes A, Alber DG, Cameron RS, Marshall RN, Allen GP, Killington RA. The production of a truncated form of baculovirus expressed EHV-1 glycoprotein C and its role in protection of C3H (H-2Kk) mice against virus challenge. *Virus Res.* 1996; 44: 97-109.
190. Tearle JP, Smith KC, Boyle MS, Bin NS, Livesay GJ, Mumford JA. Replication of equid herpesvirus 1 (EHV-1) in the testes and epididymes of ponies and venereal shedding of infectious virus. *J Comp Pathol.* 1996; 115: 385-97
191. Telford EA, Watson MS, McBride K, Davison AJ. The DNA sequence of equine herpesvirus-1. *Virology.* 1992; 189(1): 304-316.

192. Tewari D, Whalley JM, Love DN, Field HJ. Characterization of immune responses to baculovirus-expressed equine herpesvirus type 1 glycoproteins D and H in a murine model. *J Gen Virol.* 1994; 75: 1735-1741.
193. Tewari D, Nair SV, De Ungria MC, Lawrence GL, Hayden M, Love DN, et al. Immunization with glycoprotein C of equine herpesvirus-1 is associated with accelerated virus clearance in a murine model. *Arch Virol.* 1995; 140: 789-797.
194. van de Walle GR, May ML, Sukhumavasi W, von Einem J, Osterrieder N. Herpesvirus chemokinebinding glycoprotein G (gG) efficiently inhibits neutrophils chemotaxis in vitro and in vivo. *J Immunol.* 2007; 179: 4161 - 4169.
195. van de Walle GR, Peters ST, VanderVen BC, O'Callaghan DJ, Osterrieder N. Equine herpesvirus 1 Entry via Endocytosis Is Facilitated by α V Integrins and an RSD Motif in Glycoprotein D. *J Virol.* 2008; 82: 11859 - 11868.
196. van der Meulen K, Caij B, Pensaert M, Nauwynck H. Absence of viral envelope proteins in equine herpesvirus 1-infected blood mononuclear cells during cell-associated viremia. *Vet Microbiol.* 2006; 113(3-4): 265-73.
197. Van Woensel PAM, Goovaerts D, Markx D, Visser N. A mouse model for testing the pathogenicity of equine herpes virus- 1 strains. *J Virol Methods.* 1995; 54: 39-49.
198. Vázquez-Rodríguez S, Bouchan-Valencia P, González-Jiménez MA, Paredes-Vivas LY, Calixto-González R, Cébulo-Vázquez A. Mecanismos de tolerancia inmunológica en el embarazo. *Perinatol Reprod Hum.* 2011; 25 (1): 39-45.
199. Vermeulen M. Inmunidad medida por linfocitos T. Introducción a la Inmunología humana. VI Edición. En: Faimboin, L. y Geffner, J. Editorial Panamericana. 2011; 241-274.
200. Vissani MA, Becerra ML, Olguín Perglione C, Tordoya MS, Miño S, Barrandeguy M. Neuropathogenic and non-neuropathogenic genotypes of Equid Herpesvirus type 1 in Argentina. *Vet Microbiol.* 2009; 139(3-4): 361-364.

201. von Einem J, Smith PM, Van de Walle GR, O'Callaghan DJ, Osterrieder N. In vitro and In vivo characterization of equine herpesvirus type 1 (EHV - 1) mutants devoid of the viral chemokine - binding glycoprotein G (gG). *Virology*. 2007; 362: 151 - 162.
202. Wagner B, Freer H. Development of a bead-based multiplex assay for simultaneous quantification of cytokines in horses. *Vet Immunol Immunopathol*. 2009; 127:242–248.
203. Walker C, Packiarajah P, Gilkerson JR, Love DN, Whalley JM. Primary and secondary infection of mice with equine herpesvirus 1, strain HVS25A. *Virus Res*. 1998a; 57: 151-162.
204. Walker C, Perotti VM, Love DN, Whalley IM. Infection with equine herpesvirus 1 (EHV-1) strain HVS25A in pregnant mice. *J Comp Pathol*. 1998b;120, 15-27.
205. Walker C, Love DN, Whalley JM. Comparison of the pathogenesis of acute equine herpesvirus 1 (EHV-1) infection in the horse and the mouse model: a review. *Vet Microbiol*. 1999a; 68: 3-13.
206. Walker C, Perotti VM, Love DN, Whalley JM. Infection with Equine Herpesvirus 1 (EHV-1) Strain HVS25A in Pregnant Mice. *J Comp Pathol*. 1999b Vol. 120, 15–27.
207. Wang WJ, Hao CF, Yi L, Yin GJ, Bao SH, Qiu LH, et al. Increased prevalence of T helper 17 (Th17) cells in peripheral blood and decidua in unexplained recurrent spontaneous abortion patients. *J Reprod Immunol*. 2010; 84:164–170.
208. Wang WJ, Hao CF, Qu QL, Wang X, Qiu LH, Lin QD. The deregulation of regulatory T cells on interleukin-17-producing T helper cells in patients with unexplained early recurrent miscarriage. *Human Reproduction*. 2010a; 25(10); 2591–2596
209. Watson D. Replication of the viruses: morphological aspects. En: Kaplan AS. *The herpesviruses*, New York, USA, Academic Press. 1973; 133-159.
210. Wegmann T, Lin H, Gilbert L, Mosmann T. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a Th2 phenomenon? *Immunol Today*. 1993; 14: 353-356.

211. Welch HM, Bridges CG, Lyon AM, Griffiths L, Edington N. Latent herpesviruses 1 and 4: detection and distinction using the polymerase chain reaction and co-cultivation from lymphoid tissues. *J Gen Virol.* 1992; 73: 261-68.
212. Whitten WK. Pheromones and mammalian reproduction. *Adv Reprod Physiol.* 1966; 155-177.
213. Whitwell KE, Blunden AS. Pathological findings in horses dying during an outbreak of the paralytic form of Equid herpesvirus type 1 (EHV1) infection. *Equine Vet J.* 1992; 24: 13-19.
214. Widayati DT, Ohmori Y, Fukuta K. Distribution patterns of immunocompetent cells in the pregnant mouse uteri carrying allogeneic mouse and xenogeneic vole embryos. *J Anat.* 2004; 205: 45-55.
215. Wilczynski JR. Th1/Th2 cytokines balance--yin and yang of reproductive immunology. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2005;122:136-143.
216. Wimer CL, Damiani A, Osterrieder N, Wagner B. Equine herpesvirus type-1 modulates CCL2, CCL3, CCL5, CXCL9, and CXCL10 chemokine expression. *Vet Immunol Immunopathol.* 2011;140: 266-274.
217. Williamson DM, Riesco OF, Vélez C, Koncurat MA. Determinación de la concentración de IFN- γ , IL-6, IL-12, IL-15 e IL-18 en suero, extractos placentarios maternos y fetales a través de la gestación porcina. *Ciencia Veterinaria.* 2011; 13(1):31-41.
218. Wilson WD. Equine herpesvirus 1 myeloencephalopathy. *Vet Clin North Am Equine Pract.* 1997; 13: 53-72.
219. Wilson EB, Brooks DG. The role of IL-10 in regulating immunity to persistent viral infections. *Curr. Top Microbiol Immunol.* 2011; 350: 39-65. doi: 10.1007/82_2010_96. Review.
220. Wooding P, Barton G. Comparative Placentation. Structures, Functions and Evolution. Berlin, Springer-Verlag, 2008, p. 105-230.
221. Woudwyk MA, Monteavaro CE, Jensen F, Soto P, Barbeito CG, Zenclussen AC. Study of the Uterine Local Immune Response in a Murine Model of Embryonic Death Due to *Tritrichomonas foetus*. *Am J Reprod Immunol.* 2012; 68 (2): 128–137.

222. Woudwyk M. Aplicación de un modelo murino para el estudio de aspectos de la patogenia de la muerte embrionaria en la *Tritrichomonas* foetus. Tesis de Doctorado en Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. 2013.
223. Xing L, Qi Z. Pregnancy estrogen drives the changes of Tlymphocyte subsets and cytokines and prolongs the survival of H – Y skin graft in muirine model. *Chin Med J*. 2010; 123: 2593-99.
224. Ye G, Vaughan KT, Vallee RB, Roizman B. The herpes simplex virus 1 U (L) 34 protein interacts with a cytoplasmic dynein intermediate chain and targets nuclear membranes. *J Virol*. 2000; 74(3): 1355-1363.
225. Yranzo NL. Inmunobiología del embarazo: mecanismos celulares y moleculares involucrados en el mantenimiento de la unidad maternofetal. En Rabinovich GA editor. *Inmunopatología molecular: nuevas fronteras de la medicina*. Editorial Médica Panamericana S.A. Buenos Aires. Argentina. 2004; 351-358.
226. Zanuzzi CN, Scrochi MR, Fuentealba N, Nishida F, Portiansky EL, Muglia C, et al. Effects of Equid herpesvirus 1 (EHV-1) AR8 and HH1 strains on BALB-c mice. *Arch Virol*. 2014; 159: 141-145.
227. Zanuzzi CN, Bravi ME, Scrochi MR, Nishida F, Fuentealba NA, Diessler ME, et al. Microvascular lesions and changes in cell proliferation and death, and cytokine expression in the placentas of mice experimentally infected with Equid Herpesvirus 1. *Res Vet Sci*. 2016; 109: 121–128.
228. Zenclussen AC. CD4(+)CD25+ T regulatory cells in murine pregnancy. *J Reprod Immunol*. 2005, 65: 101-110.
229. Zenclussen AC. Regulatory T cells in pregnancy. *Springer Semin Immunopathol*. 2006; 28: 31-39.
230. Zenclussen AC, Gerlof K, Zenclussen ML, Ritschel S, Zambon Bertoja A, Fest S, et al. Regulatory T cells induce a privileged tolerant microenvironment at the fetal-maternal interface. *Eur J Immunol*. 2006a; 36: 82-94.
231. Zenclussen AC, Schumacher A, Zenclussen ML, Wafula P, Volk HD. Immunology of pregnancy: cellular mechanisms allowing fetal survival within the maternal uterus. *Exp Rev Mol Med*. 2007; 9: 1-14.

232. Zhang J, Chen Z, Smith GN, Croy BA. Natural killer cell-triggered vascular transformation: maternal care before birth?. *Cell Mol Immunol*. 2011; 8 (1): 1-11.

ANEXOS

1- EXTRACCIÓN DE ARN

Pesar la muestra. El tejido a procesar debe pesar 100 mg aproximadamente.

Colocar la muestra en un eppendorf y homogeneizarla con micropistillos

Agregar 1 ml de TRIzol y 220 ul de cloroformo.

Vortex 10 minutos

Centrifugar 10 minutos a 12000 RPM.

Tomar el sobrenadante con pipeta y colocarlo en un eppendorf nuevo.

Agregar 750 ul de isopropanol.

Colocarlo 15 minutos a -70°C.

Centrifugar 10 minutos a 10000 RPM.

Descartar el sobrenadante.

Agregar 500 ul de etanol 70°

Centrifugar 1 minuto a 12000 RPM.

Descartar sobrenadante

Dejar secar

Resuspender con agua estéril autoclavada (libre de RNAsas) 50 ul o 20 ul.

2- RETRO TRANSCRIPCIÓN (RT)

5ul de molde

1ul RandomPrimers

9ul agua destilada estéril (libre de DNAsas)

15ul total (A)

Incubar 5-10 minutos a 70°C

Enfriar en hielo 2 minutos

5ul Buffer para enzima MMLV (200U/ul)
1ul enzima MMLV
1ul dntp's
1ul RNAsin
2ul agua destilada estéril (libre de DNAsas)
<hr/>
10ul total (B)

Juntar (A) + (B)total 25ul e incubar 60 minutos a 37°C

3- qPCR
Mezcla Real: 12,5 ul
Agua: 9,5 ul
Molde: 2 ul
Primers: 1 ul

4- Soluciones para la técnica de enzimo inmuno ensayo(ELISA)

Buffer carbonato-bicarbonato pH 9,6

50mM Na₂CO₃ (Invitrogen, USA)

50mM NaHCO₃ (Invitrogen, USA)

Solución de Lavado

PBS + 0,05% monolaureato de polioxietilensorbitano -Tween-20-(Anedra, Brasil)

Solución de bloqueo

PBS + 0,1% de seroalbúmina bovina (WACOPURE Chemicals, Japón)

Solución de Sustrato

0,1M (50ml) ácido cítrico (Merck, Argentina)

0,2M (50ml) PO₄HNa₂ (Invitrogen, USA)

0,01 % de H₂O₂ 30 vol

0,03 mg/ml de ABTS(2,2' azino-bis(3ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)) (SIGMA, USA)